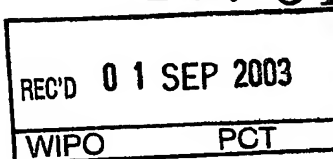


PCT/FR 03/01851
10/518019

15 DEC 2004

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 23 JUIN 2003**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

BEST AVAILABLE COPY

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



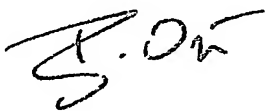

N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DS 540 W / 260899

REMISE DES FICHES DATE 21 JUIN 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 21 JUIN 2002 Vos références pour ce dossier (facultatif) BLO/CGA/cp263/83FR		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6 avenue de Messine 75008 PARIS	
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	Date
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) POLYNUCLEOTIDES ET POLYPEPTIDES CODES PAR LESDITS POLYNUCLEOTIDES IMPLIQUES DANS LA SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS DES DICETOPIPERAZINES.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	31-33 rue de la Fédération	
	Code postal et ville	75015	PARIS
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE 14 JAN 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0207728 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		BLO/CGA/cp263/83FR
6 MANDATAIRE		
Nom		ORES
Prénom		Béatrice
Cabinet ou Société		CABINET ORES
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	6 avenue de Messine
	Code postal et ville	75008 PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.45.62.75.00.
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.62.04.86.
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		ores@cabinet-ores.com
7 INVENTEUR (S)		
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée
8 RAPPORT DE RECHERCHE Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence) :</i>
Si vous avez utilisé l'imprimé « Suite », Indiquez le nombre de pages jointes		1
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) ORES Béatrice (n° 92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
Page suite N° 1.../1...

RÉSERVÉ À L'INPI	
REMISE DES PIÈCES	02 JUIN 2002
DATE	75 INPI PARIS
LIEU	0207728
N° D'ENREGISTREMENT	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLO/CGA/cp263/83FR	
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE	Pays ou organisation		
	Date	/ /	N°
	Pays ou organisation		
	Date	/ /	N°
	Pays ou organisation		
	Date	/ /	N°
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR			
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	3 rue Michel-Ange	
	Code postal et ville	75794	PARIS Cedex 16
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR			
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Pays			
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) ORES Béatrice (n° 92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

Polynucléotides et polypeptides codés par lesdits polynucléotides impliqués dans la synthèse de dérivés des dicétopipérazines

La présente Invention est relative à de nouveaux
5 polynucléotides isolés, naturels ou synthétiques, et aux polypeptides codés
par lesdits polynucléotides, impliqués dans la synthèse de dérivés des
dicétopipérazines, aux vecteurs comprenant lesdits polynucléotides, aux
microorganismes transformés avec lesdits polynucléotides, aux applications
desdits polynucléotides et desdits polypeptides, ainsi qu'à des procédés de
10 synthèse de dérivés des dicétopipérazines dont des cyclodipeptides et des
dicétopipérazines substituées en position 3 et 6 par des chaînes latérales
d'acides aminés α,β -insaturées.

Par dérivés de dicétopipérazines, on entend au sens de la
présente Invention des molécules ayant un noyau dicétopipérazine
15 (pipérazine-2,5-diones ou 2,5-dioxopipérazines ou 2,5-DKP), substitué en
positions 3 et 6 par des acides aminés. Dans le cas particulier des
cyclodiaminoacides (cyclodipeptides ou dipeptides cycliques), les groupes
substituants en position 3 et 6 sont les chaînes latérales d'acides aminés. Dans
le cas particulier des cyclo-bi-déshydro-di-aminoacides (cyclo-bisdéshydro-
20 dipeptides), les groupes substituants en position 3 et 6 sont les chaînes
latérales des acides aminés α,β -insaturés (Figure 1).

Les dérivés des dicétopipérazines constituent une famille de
composés essentiellement produits par les microorganismes tels que les
bactéries, les levures, les champignons filamenteux et les lichens. D'autres
25 ont également été isolés dans des organismes marins tels que les éponges et
les étoiles de mer. Un exemple de ces métabolites a été mis en évidence
chez l'homme, le cyclo(L-His-L-Pro).

Les dérivés des dicétopipérazines présentent des structures
très variées allant des cyclodipeptides simples à des structures beaucoup plus
30 complexes.

Les cyclodipeptides simples ne constituent qu'une faible fraction des dérivés des dicétopipérazines dont l'immense majorité présente des structures plus complexes où le cycle principal et/ou les chaînes latérales comportent de nombreuses modifications : introduction de groupements carbonés, hydroxyle, nitro, époxy, acétyle, ou méthoxy, ainsi que la formation de ponts disulfures ou d'hétérocycles. La formation de double liaison entre deux carbones est également assez répandue. Certains métabolites d'origine marine incorporent des halogènes.

Quelques exemples d'acides aminés incorporés dans les cyclodipeptides sont présentés dans le Tableau I suivant :

Tableau I

Cyclodipeptide	Organisme
Cyclo(Gly-L-Pro)	<i>Luidia clathrata</i>
Cyclo(L-Pro-L-Leu)	<i>Rosellinia necatrix</i>
Cyclo(L-Ala-L-Val)	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Cyclo(L-Ala-L-Leu)	<i>Aspergillus niger</i>
Cyclo(D-Ala-N-méthyl-L-Leu)	<i>Beauveria nivea</i>
Cyclo(L-Pro-L-Val)	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Cyclo(L-Pro-L-Leu)	<i>Rosellinia necatrix</i>
Cyclo(D-Val-L-Trp)	<i>Aspergillus chevalieri</i>
Cyclo(L-Phe-L-Phe)	<i>Penicillium nigricans</i> <i>Streptomyces noursei</i>
Cyclo(Δ Phe- Δ Leu) (albonoursine)	<i>Streptomyces noursei</i>
Cyclo(L-Pro-L-Tyr)	<i>Alternaria alternata</i>
Cyclo(L-Pro-L-Trp)	<i>Penicillium brevicompactum</i>
Cyclo(L-Ser-L-Ser)	<i>Streptomyces orchidaceus</i>
Cyclo(L-Arg-D-Pro)	<i>Pseudomonas</i> sp.
Phénylahistine	
Roquefortine	<i>Penicillium roquefortii</i>
Cyclo(L-Trp- Δ Aba)	<i>Streptomyces spectabilis</i>
Cyclo(4-méthyl-D-Pro-L-Nva)	<i>Calyx</i> cf. <i>podatypa</i>
Cyclo(Δ Ala-L-Val)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Peu de choses sont connues quant au rôle physiologique des dérivés des dicétopipérazines. Il a été décrit que le cyclo(Δ Ala-L-Val) produit

par *Pseudomonas aeruginosa* pourrait être impliqué dans les signaux de communication interbactériens. D'autres composés sont décrits comme impliqués dans la virulence de microorganismes pathogènes ou encore comme se liant au fer ou comme possédant des propriétés neurobiologiques.

5 Les dérivés des dicétopipérazines se sont avérés intéressants depuis qu'il a été découvert pour certains d'entre eux des propriétés biologiques telles que par exemple des activités anti-bactériennes, antifongiques, antivirales, immunosuppressives ou encore anti-tumorales.

10 Le Tableau II suivant présente quelques exemples de dérivés des dicétopipérazines ayant une activité biologique connue :

Tableau II

Molécules	Organisme	Activité
Ambewelamides A et B	<i>Usnea</i> sp.	Cytotoxicité
Arañotiné	<i>Arachniotus aureus</i>	Antiviral
Bicyclomycine	<i>Streptomyces sapporonensis</i>	Antibactérien (Inhibition de la terminaison de la transcription)
Cyclo(Δ -Ala-L-Leu)	<i>Penicillium</i> sp. (F70614)	Inhibition de l' α -glucosidase
Cyclo(N-methyl-Tyr) ₂	<i>Streptomyces griseus</i>	Inhibition de la calpaine
Cyclo(Trp- Δ -Aba)	<i>Streptomyces spectabilis</i>	Inhibition de la glutathion-S-transférase
Gliotoxine	<i>Aspergillus flavus</i>	Herbicide, antifongique, antibactérien, antiviral
Haematocine	<i>Nectria haematococca</i>	Antifongique
Hyalodendrine	<i>Penicillium turbatum</i>	Antibiotique
Mycélianamide	<i>Penicillium</i> sp.	Antibactérien (Inhibition de la butylcholinestérase)
Phénylahistine	<i>Aspergillus ustus</i> (NSC-FO38)	Inhibition de la polymérisation des microtubules
Tan-1496 A, C et E	<i>Microphaeropsis</i> sp. (FL-16144)	Inhibition de topoisomérase I Antibactérien (Gram +)
Verticilline A	<i>Gliocladium</i> sp. (SCF-1168)	Inhibition de l'induction du protooncogène c-fos

XR334	Streptomyces (X01/4/100)	sp.	Inhibition du PAI-I
-------	-----------------------------	-----	---------------------

Bien que l'étude de ces molécules se soit largement développée, peu de choses sont connues en ce qui concerne leur synthèse. On sait que généralement, chez les bactéries et chez les champignons, ces molécules sont produites par biosynthèse non-ribosomique. Dans certains cas, il a pu être montré que la formation du cycle dicétopipérazine se produit dans des molécules qui sont au préalable activées via une liaison thioester à une enzyme et pour lesquelles la conformation en cis de la liaison peptidique, nécessaire à la réaction de cyclisation, est favorisée par la présence de résidus proline. Dans d'autre cas, il a été mis en évidence que la N-alkylation, particulièrement la N-méthylation, des résidus d'acides aminés favorise également la conformation en cis de la liaison peptidique.

Ainsi toutes les études menées jusqu'à présent ont démontré que la structure primaire de la molécule précurseur, conditionnant sa conformation, est fondamentale pour que la formation du cycle dicétopipérazine se réalise et que le processus aboutisse à la production du dérivé de dicétopipérazine final.

Mais il existe des dérivés des dicétopipérazines qui ne contiennent pas de résidu proline ni de résidu N-alkylé. A titre d'exemple de tels dérivés, on peut citer l'albonoursine ou cyclo(Δ Phe- Δ Leu), antibiotique produit par *Streptomyces noursei*. Il est connu qu'il existe dans *Streptomyces noursei* une activité enzymatique qui catalyse la dernière étape de la production de l'albonoursine, à savoir la formation des résidus α,β -insaturés (GONDROY et Col., Eur. J. Biochem., 2001, 268, 1712-1721). Toutefois, cette activité enzymatique nécessite un substrat sous forme cyclique, le cyclo(L-Phe-L-Leu), qui ne contient pas de résidu proline ni de résidu N-alkylé et dont la voie de synthèse est inconnue.

Ainsi, les dérivés des dicétopipérazines présentent-ils une très grande diversité de structure et des activités biologiques très variées qui en font des molécules intéressantes pour la découverte et la mise au point de nouveaux médicaments ayant d'autres propriétés intéressantes.

Pour ce faire, il est nécessaire de pouvoir disposer de grandes quantités de ces molécules.

Certes des voies de synthèse chimique de dérivés des dicétopipérazines ont été décrites, mais pour les dérivés les plus complexes les rendements sont faibles et les procédés ne sont pas toujours industrialisables.

5 Comprendre les voies de synthèse naturelle des dérivés des dicétopipérazines, particulièrement celle des cyclodipeptides, pourrait permettre l'amélioration génétique raisonnée des organismes producteurs, et ouvrirait des perspectives pour substituer ou améliorer les procédés de synthèse existants (par des voies chimiques ou biotechnologiques) grâce à
10 l'optimisation des rendements de production et de purification. En outre, la modification de la nature et/ou de la spécificité des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des dérivés de dicétopipérazine pourrait conduire à la création de nouveaux dérivés aux structures moléculaires originales et aux propriétés biologiques optimisées.

15 C'est dans ce cadre que se situe la présente Invention.

En étudiant la voie de synthèse de l'albonoursine, les Inventeurs ont mis en évidence un polynucléotide (ci-après dénommé polynucléotide BamH1 (SEQ ID N°5)), comprenant quatre phases ouvertes de lecture codant chacune pour un polypeptide responsable de chacune des
20 étapes de la synthèse et du transport de l'albonoursine à partir de résidus L-phénylalanine et L-leucine chez *Streptomyces noursei* et chez des hôtes hétérologues comme *Streptomyces lividans* (voir Figures 2 et 3).

Les Inventeurs ont pu montrer que :

- la première phase ouverte de lecture orf1 (albA, SEQ ID N°1) code
25 pour un polypeptide (AlbA, SEQ ID N°6) impliqué dans une activité cyclodipeptide oxydase (CDO) telle que celle décrite dans GONDRY et al., (Eur. J. Biochem., 2001, 268, 1712-1721) (α,β -désaturation).
- la deuxième phase ouverte de lecture orf2 (albB, SEQ ID N°2) code
30 pour un polypeptide qui est traduit sous deux isoformes (AlbB₁, SEQ ID N°7 et AlbB₂, SEQ ID N° 8) nécessaires à l'activité du polypeptide AlbA. Les deux isoformes d'AlbB qui sont exprimées en quantité à peu près équivalentes, se différencient par la présence de 5 acides aminés supplémentaires localisés à l'extrémité N-terminale d'AlbB₁ et résultant de l'utilisation de deux codons d'initiation différents. Dans le cas d'AlbB₁, la méthionine initiale est éliminée.

- la troisième phase ouverte de lecture orf3 (albC, SEQ ID N°3) code pour un polypeptide (AlbC, SEQ ID N° 9) ne présentant aucune similitude avec une peptide-synthétase et qui est capable de catalyser la condensation de deux résidus d'acides aminés pour former un dipeptide cyclique. Par exemple chez *Streptomyces noursei*, AlbC catalyse la condensation d'une L-phénylalanine et d'une L-leucine ou de deux L-phénylalanines, pour former le dipeptide cyclique cyclo(L-Phe-L-Leu), précurseur nécessaire à la formation de l'albonoursine et le dipeptide cyclique cyclo(L-Phe-L-Phe). Dans ce cas particulier, AlbC catalyse la cyclisation de résidus d'acides aminés qui ne sont ni une proline ni un résidu N-alkylé, et

- a quatrième phase ouverte de lecture orf4 (albD, SEQ ID N°4) code pour un polypeptide (AlbD, SEQ ID N°10) qui n'intervient pas directement dans la succession de réactions aboutissant à partir d'acides aminés à la formation de dérivés des dicétopipérazines α,β -insaturées, mais est probablement impliqué dans le mécanisme de transport desdits dérivés.

Les Inventeurs ont ainsi montré que pour la synthèse de dérivés des dicétopipérazines α,β -insaturées, seules les trois phases ouvertes de lecture albA, albB et albC sont absolument nécessaires, particulièrement pour la synthèse de l'albonoursine chez *Streptomyces noursei*.

Ainsi l'Invention a pour objet un polynucléotide isolé, naturel ou synthétique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les trois phases ouvertes de lecture albA, albB et albC correspondant respectivement aux séquences SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 et SEQ ID N° 3.

Ce polynucléotide code pour les enzymes nécessaires à la synthèse des dérivés dicétopipérazines α,β -insaturées.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'Invention, ledit polynucléotide comprend en outre la phase ouverte de lecture albD correspondant à la séquence SEQ ID N° 4.

Ce polynucléotide code pour les enzymes nécessaires à la synthèse des dérivés dicétopipérazines α,β -insaturées et à leur transport et leur sécrétion.

Selon une forme particulière de l'Invention, le polynucléotide répond à la séquence SEQ ID N° 5. Ce polynucléotide (polynucléotide BamH1) contient les quatre phases ouvertes de lecture albA, albB, albC et

albD et code donc pour les enzymes nécessaires à la synthèse des dérivés dicétopipérazines α,β -insaturées et à leur transport et leur sécrétion.

L'Invention a aussi pour objet un polynucléotide isolé, naturel ou synthétique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'une des trois phases ouvertes de lecture albB, albC et albD correspondant respectivement
5 aux séquences SEQ ID N°2, SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4.

Ainsi, le polynucléotide comprenant la phase ouverte de lecture albC (SEQ ID N° 3) code pour une enzyme permettant la cyclisation de deux acides aminés, identiques ou différents pour former un dipeptide cyclique. Le polynucléotide comprenant les phases ouvertes de lecture albC
10 et albD (SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4) code pour les enzymes permettant d'une part la cyclisation de deux acides aminés, identiques ou différents pour former un dipeptide cyclique et d'autre part le transport dudit dipeptide.

L'Invention a également pour objet un polynucléotide isolé, naturel ou synthétique, répondant à l'une quelconque des séquences SEQ ID
15 N° 2 (albB, 318 nucléotides), SEQ ID N° 3 (albC, 720 nucléotides) ou SEQ ID N° 4 (albD, 834 nucléotides).

L'invention a aussi pour objet des fragments des polynucléotides tels que définis ci-dessus. Par fragment, on entend toute
20 séquence d'au moins 15 acides nucléiques.

Le polynucléotide selon l'Invention peut être obtenu à partir de banques d'ADN, particulièrement de banques d'ADN de micro-organismes, très particulièrement à partir d'une banque d'ADN de *Streptomyces noursei*. Le polynucléotide de l'Invention peut également être obtenu par une réaction
25 de polymérisation en chaîne (PCR) effectuée sur l'ADN total de *Streptomyces noursei*. Les polynucléotides selon l'Invention peuvent être obtenus par RT-PCR effectuée sur les ARN totaux de *Streptomyces noursei*.

L'Invention a également pour objet un vecteur dans lequel est inséré l'un quelconque des polynucléotides précédemment décrits. Ainsi, le
30 vecteur de l'Invention peut comprendre le polynucléotide comprenant les trois ou les quatre phases ouvertes de lecture albA, albB, albC et/ou albD, correspondant respectivement aux séquences SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 et/ou SEQ ID N° 4, le polynucléotide comprenant au moins l'une des trois phases ouvertes de lecture albB, albC ou albD correspondant
35 respectivement aux séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4,

l'un quelconque des polynucléotides répondant à l'une au moins des trois phases ouvertes de lecture albB, albC ou albD correspondant respectivement aux séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4, le polynucléotide BamH1 répondant à la séquence SEQ ID N°5 ou encore un fragment desdits polynucléotides.

Le vecteur utilisé peut être tout vecteur connu de l'art antérieur. Particulièrement, on peut citer comme vecteurs utilisables selon l'invention, les plasmides, les cosmides, les chromosomes artificiels bactériens (BAC), les éléments intégratifs d'actinobactéries, les virus ou encore les bactériophages.

Ledit vecteur peut comporter en outre toutes séquences régulatrices requises pour la réplication du vecteur et/ou l'expression du polypeptide codé par le polynucléotide (promoteur, sites de terminaison, etc).

L'invention a également pour objet l'utilisation de l'un au moins des polynucléotides tels que définis précédemment ou de l'un de ses fragments comme sonde pour détecter des séquences correspondantes dans d'autres organismes ou comme amorce pour l'amplification de telles séquences.

Lorsqu'il s'agit d'amorces, lesdits polynucléotides ou lesdits fragments incluent également les séquences anti-sens.

Une des utilisations préférentielle des sondes ou amorces précédemment décrites est la recherche de séquences polynucléotidiques homologues aux séquences des phases ouvertes de lecture albA, albB, albC ou albD dans d'autres organismes, afin en particulier de mettre en évidence de nouvelles voies de synthèse de dérivés des dicétopipérazines.

L'invention a également pour objet un polypeptide isolé, naturel ou synthétique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'une quelconque des séquences SEQ ID NO : 7 à SEQ ID NO : 10, correspondant respectivement aux polypeptides AlbB₁, AlbB₂, AlbC ou AlbD.

L'invention a pour objet un polypeptide isolé, naturel ou synthétique, caractérisé en ce qu'il répond à l'une quelconque des séquences SEQ ID N° : 7 (AlbB₁), SEQ ID N° : 8 (AlbB₂), SEQ ID N° : 9 (AlbC) ou SEQ ID N°10 (AlbD).

L'Invention concerne également les polypeptides codés par l'un quelconque des polynucléotides de l'Invention, particulièrement l'un quelconque des polynucléotides choisi parmi l'une quelconque des séquences SEQ ID N° 2 (albB), SEQ ID N° 3 (albC) ou SEQ ID N° 4 (albD).

5 De manière avantageuse, les polypeptides selon l'Invention peuvent être soit isolés de microorganismes (*Streptomyces noursei* par exemple), soit obtenus par synthèse chimique ou encore par des moyens biotechnologiques, à partir des polynucléotides de l'Invention, comme par exemple à partir de microorganismes modifiés, qui n'expriment normalement
10 pas lesdits polypeptides.

L'Invention a également pour objet un polypeptide isolé, dont la séquence est substantiellement homologue à l'une au moins des séquences SEQ ID N° : 7 à SEQ ID N° : 10, telles que définies ci-dessus.

On considère ici qu'un polypeptide présente une séquence
15 substantiellement homologue lorsque sa séquence en acides aminés présente au moins 80% de similarité avec la séquence en acides aminés d'au moins l'une des séquences SEQ ID NO : 7 à SEQ ID NO : 10 et que le polypeptide a conservé son activité initiale.

Par 80% de similarité entre un polypeptide P et les séquences
20 SEQ ID NO 7 à 10, on entend que lorsque les deux polypeptides sont alignés, 80% des acides aminés de P sont identiques à l'acide aminé correspondant des séquences SEQ ID NO 7 à 10 ou sont remplacés par un acide aminé du même groupe.

Par acide aminé de même groupe, on entend un acide aminé
25 possédant des propriétés chimiques sensiblement identiques. En particulier, on entend par ce terme des acides aminés ayant sensiblement la même charge et/ou la même taille, et/ou la même hydrophilie ou hydrophobie et/ou la même aromaticité.

De tels groupes d'acides aminés incluent notamment ;

- 30
- (i) glycine, alanine
 - (ii) isoleucine, leucine, valine
 - (iii) tryptophane, tyrosine, phénylalanine
 - (iv) acide aspartique, acide glutamique

(v) arginine, lysine, histidine

(vi) sérine, thréonine

D'autres substitutions peuvent être envisagées, dans lesquelles on remplace un acide aminé par un autre acide aminé comparable
5 mais non naturel (hydroxyproline, norleucine, ornithine, citrulline, cyclohexylalanine, acides aminés dextrogyres,).

L'invention a également pour objet l'utilisation des polynucléotides ou des vecteurs de l'invention tels que décrits précédemment pour la synthèse de polypeptides correspondant aux séquences SEQ ID NO :
10 7 à 10.

L'invention a également pour objet l'utilisation, particulièrement in vitro, des polypeptides selon l'invention, seuls ou en combinaison, pour la préparation de cyclodipeptides et/ou de dérivés des dicétopipérazines substituées en positions 3 et 6 par des chaînes latérales
15 d'acides aminés α, β -insaturées, particulièrement de l'albonoursine.

L'invention a également pour objet l'utilisation des polypeptides de l'invention, seuls ou en combinaison, pour modifier l'activité pharmacologique d'une molécule biologique en modifiant sa structure, par exemple par déshydrogénation de chaînes latérales, particulièrement de
20 chaînes latérales d'acides aminés ou par cyclisation, particulièrement de molécules peptidiques.

L'invention a aussi pour objet un système biologique modifié dans lequel, au moins un polynucléotide selon l'invention ou au moins un vecteur selon l'invention a été introduit.

25 Un tel système biologique peut être tout système d'expression hétérologue connu, utilisant comme hôtes des procaryotes ou des eucaryotes. A titre d'exemple on peut citer un microorganisme comme une bactérie telle que Escherichia coli ou Streptomyces lividans ou des cellules animales ou d'insectes.

30 L'invention a aussi pour objet un système acellulaire in vitro modifié dans lequel, au moins un polynucléotide selon l'invention ou au moins un vecteur selon l'invention a été introduit.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'au moins un polynucléotide selon l'invention et/ou d'au moins un vecteur de l'invention

pour la préparation d'un système biologique modifié, celui-ci pouvant être un microorganisme, comme une bactérie telle que *Escherichia coli* ou *Streptomyces lividans* ou tout système d'expression hétérologue connu utilisant comme hôtes des procaryotes ou des eucaryotes, ou encore d'un

5 système acellulaire in vitro modifié.

L'introduction du polynucléotide et/ou du vecteur selon

l'Invention dans le système biologique modifié hôte, peut se faire par toute méthode connue, comme par exemple la transfection, l'infection, la fusion, l'électroporation, la microinjection ou encore la biolistique.

10 L'Invention a aussi pour objet l'utilisation d'au moins un système biologique modifié ou d'un système acellulaire in vitro modifié, tels que décrit précédemment, pour la préparation de cyclodipeptides et/ou de dérivés des dicétopipérazines substituées en positions 3 et 6 par des chaînes latérales d'acides aminés α,β -insaturées, particulièrement de l'albonoursine.

15 Les systèmes biologiques sont adaptés à la synthèse, avec un bon rendement, des cyclodipeptides et des dérivés de dicétopipérazines α,β -insaturées, tels que définis précédemment.

Lorsqu'il s'agit d'un microorganisme, le système biologique modifié peut éventuellement en outre permettre la sécrétion du dérivé

20 dicétopipérazine selon l'Invention dans un milieu de culture rendant son extraction et sa purification plus faciles. La présence de AlbD dans les systèmes biologiques tels que les microorganismes constitue une étape avantageuse pour le procédé industriel en facilitant l'extraction et la purification du dérivé qui serait ainsi secrété dans le milieu de culture.

25 L'Invention a également pour objet un procédé de synthèse in vitro d'un cyclodipeptide, caractérisé en ce que dans une première étape on met en contact, dans des conditions convenables, deux acides aminés, identiques ou différents, et AlbC (SEQ ID N°9) et que dans une deuxième étape on purifie le cyclodipeptide obtenu.

30 L'Invention a aussi pour objet un procédé de synthèse in vitro d'un dérivé de dicétopipérazines, substitué en position 3 et 6 par des chaînes latérales d'acides aminés α,β -insaturées, caractérisé en ce que dans une première étape on met en contact, dans des conditions convenables, deux acides aminés, identiques ou différents, avec AlbC (SEQ ID N° 9) et que dans

35 une deuxième étape on met en contact le cyclodipeptide obtenu à la première

étape avec AlbA (SEQ ID N° 6) et AlbB1 (SEQ ID N° 7) et AlbB2 (SEQ ID N° 8), et que l'on purifie le dérivé de dicétopipérazines α,β -insaturé obtenu. Le procédé peut en outre inclure à la deuxième étape le polypeptide AlbD (SEQ ID N° 10). Le procédé peut éventuellement comprendre entre l'étape une et l'étape deux, une étape supplémentaire de purification du cyclodipeptide obtenu à la première étape.

Ce procédé peut bien entendu être réalisé en une seule étape dans laquelle on met en contact dans des conditions convenables, deux acides aminés, identiques ou différents avec AlbA (SEQ ID N° 6), AlbB1 (SEQ ID N° 7), AlbB2 (SEQ ID N° 8) et AlbC (SEQ ID N° 9), éventuellement AlbD (SEQ ID N° 10), et que l'on purifie le dérivé de dicétopipérazines α,β -insaturé obtenu.

Par conditions convenables, on entend les conditions dans lesquelles on incube :

- les polypeptides (AlbA, AlbB, AlbC et/ou AlbD) à des concentrations comprises entre 0,1 nM et 10 μ M, de préférence entre 10 nM et 1 μ M ;
- en présence d'acides aminés identiques ou différents à une concentration comprise entre 0,1 mM et 100 mM, de préférence entre 1 mM et 10 mM ;
- dans un tampon 0,1 M Tris-HCl, ayant un pH compris entre 6,8 et 8,0, à une température comprise entre 28°C et 40°C pendant une durée comprise entre 2 heures et 48 heures.

L'invention a également pour objet un procédé de synthèse d'un cyclodipeptide, caractérisé en ce que dans une première étape on met en contact un système biologique comprenant au moins le polynucléotide SEQ ID N° 3 (albC, codant pour AlbC), dans des conditions appropriées à la culture dudit système biologique choisi, et que dans une deuxième étape on purifie le cyclodipeptide obtenu. Le système biologique peut en outre comprendre le polynucléotide SEQ ID N°4 (codant pour AlbD).

L'invention a également pour objet un procédé de synthèse d'un dérivé de dicétopipérazine, substitué en position 3 et 6 par des chaînes latérales d'acides aminés α,β -insaturées, caractérisé en ce que dans une première étape l'on met en contact un système biologique comprenant le polynucléotide correspondant aux séquences SEQ ID N°1 à 3 (codant pour

AlbA, AlbB, et AlbC), dans des conditions appropriées à la culture dudit système biologique choisi, et que dans une deuxième étape on purifie le dérivé de dicétopipérazines α,β -insaturé obtenu. Le système biologique peut en outre comprendre le polynucléotide correspondant à la séquence SEQ ID N°4 (codant pour AlbD).

Par conditions appropriées à la culture dudit système biologique choisi, on comprend que le procédé est mis en œuvre dans les conditions de culture du système biologique choisi incluant un milieu de culture approprié contenant un large excès en acides aminés. Par exemple, si le système biologique est un microorganisme comme par exemple *Escherichia coli*, les conditions appropriées sont celles couramment utilisées pour la culture de cette bactérie. Il en est de même pour *Streptomyces lividans* ou si le système biologique est une cellule eucaryote.

Selon les procédés de l'Invention, les acides aminés, identiques ou différents, sont présents en une quantité comprise entre 0,1 mM et 100 mM, de préférence entre 1 mM et 10 mM.

De même, selon les procédés de l'Invention, les polypeptides AlbA, AlbB, AlbC et AlbD sont présents en une quantité comprise entre 0,1 nM et 10 μ M, de préférence entre 10 nM et 1 μ M.

La purification des cyclodipeptides et dicétopipérazine α,β -insaturés peut être faite directement à partir de synthèses in vivo ou in vitro par des techniques d'extraction en phase liquide ou par précipitation, ou des techniques de chromatographie en couche mince ou en phase liquide, en particulier l'HPLC en phase inverse ou toute méthode appropriée à la purification des peptides, bien connu de l'homme du métier.

Les procédés de l'Invention peuvent être réalisés dans tout système biologique approprié, particulièrement dans un hôte, comme par exemple un microorganisme comme une bactérie telle que *Escherichia coli* ou *Streptomyces lividans* ou tout système d'expression hétérologue connu utilisant comme hôtes des procaryotes ou des eucaryotes, voire des systèmes acellulaires in vitro.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'Invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- La Figure 1 représente les structures chimiques d'un noyau dicétopipérazine (A) et de l'albonoursine (B).

5 - La Figure 2 représente un schéma de la région génomique de *Streptomyces noursei* incluant le cluster de gènes nécessaire à la synthèse de l'albonoursine, dans laquelle orf1 correspond à albA, orf 2 correspond à albB, orf3 correspond à albC et orf 4 correspond à albD.

- La Figure 3 représente la voie de synthèse supposée de l'albonoursine dans *Streptomyces noursei*.

10 - La Figure 4 représente certaines constructions plasmidiques réalisées pour l'introduction de différentes orf dans *Escherichia coli* ou *Streptomyces lividans*.

15 - La Figure 5 représente les résultats des analyses des milieux de culture de *Streptomyces lividans*, transformée par introduction des plasmides pSL128 (A), pUWL201 (B) et pSL129 (C).

- La Figure 6 représente les résultats des analyses des milieux de culture de *Streptomyces lividans*, transformée par introduction des plasmides pSL168 et pSL159, ou de *Streptomyces lividans* non transformée :

A : *S. lividans*[pSL168], incubée en présence de CDO ;

20 B : *S. lividans*[pSL168], incubée en absence de CDO ;

C : *S. lividans*[pSL159] en absence ou en présence de CDO ;

D : *Streptomyces lividans* TK21 incubée en présence de CDO.

25 - La Figure 7 représente l'analyse par gel de polyacrylamide / sodium dodecylsulfate (SDS-PAGE) de l'expression de AlbA et AlbB₁ et AlbB₂ à partir du polynucléotide albA-albB dans *E. coli* BL21(DE3)-plysS. Coloration au bleu de Coomassie brillant R-250. Ligne S : Standard de poids moléculaire, ligne 1 : extrait cytoplasmique total (environ 10 µg), ligne 2 : fraction enzymatique purifiée sur colonne Ni-sépharose (environ 10 µg).

30 Les exemples suivants sont illustratifs de l'Invention et ne la limitent aucunement.

EXEMPLE 1 : Isolement du polynucléotide de l'invention chez *Streptomyces noursei*

Un polynucléotide contenant l'ensemble de l'information
 5 génétique nécessaire pour la biosynthèse de l'albonoursine chez
~~Streptomyces noursei a été isolé du génome total de ce microorganisme, par~~
 une approche basée sur l'amplification génique par PCR.

- Obtention de séquences peptidiques partielles de la
 cyclodipeptide oxydase :

10 Des informations partielles de séquences peptidiques sur
 l'enzyme catalysant, chez *Streptomyces noursei*, la conversion du
 cyclodipeptide cyclo(L-Phe-L-Leu) en albonoursine, nommée cyclodipeptide
 oxydase (CDO), ont été obtenues par séquençage direct par la méthode
 d'Edman de polypeptides issus de l'hydrolyse trypsique de l'enzyme purifiée
 15 selon le protocole décrit dans Gondry M. et al. (Gondry et al. 2001, article
 précité). Après séparation des constituants de la fraction enzymatique par
 électrophorèse en gel de polyacrylamide à 15 % et coloration des protéines
 au bleu de Coomassie, une bande de gel contenant la protéine de masse
 moléculaire d'environ 21.000 daltons est découpée et incubée dans 1 ml de
 20 tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, en présence de trypsine (concentrations
 relatives trypsine/substrat = 1/50), pendant 20 heures à 37°C. Les
 polypeptides obtenus sont ensuite séparés par chromatographie liquide haute
 performance (HPLC) en phase inverse (colonne μ RPC C₂/C₁₈ SC21/10,
 Pharmacia) par un gradient linéaire de 0% à 76% en acétonitrile en 62
 25 minutes (solvant : 0,1% acide trifluoroacétique; débit : 1ml/min). Chacun des
 polypeptides séparés est ensuite purifié par chromatographie de perméation
 de gel sur une colonne superdex peptide PC32/30 (Pharmacia) équilibrée en
 tampon contenant 30 % d'acétonitrile et 0,1 % d'acide trifluoroacétique. Trois
 des polypeptides obtenus ont été finalement analysés par séquençage
 30 automatique par la méthode d'Edman (séquenceur modèle 477A, Applied
 Biosystems) et par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le Tableau I
 présente les séquences peptidiques obtenues ainsi que les séquences
 nucléotidiques qui en ont été déduites.

Tableau I :

Séquence peptidique	Sequence nucléotidique déduite
<u>EPVDD</u> ALIEQLLEAMLAAPT (SEQ ID N°11)	GARCCSGTSGACGACGC (oligo1f) (SEQ ID N°14)
	GCGTCGTCSACSGGYTC (oligo1r) (SEQ ID N°15)
<u>NEVVNY</u> EXWGNR (SEQ ID N°12)	AACGARGTSGTSAACTACGA (oligo2f) (SEQ ID N°16)
	TCGTAGTTSACSACYTCGTT (oligo2r) (SEQ ID N°17)
<u>QAXSFMVVR</u> (SEQ ID N°13)	CAGGCSTGGWSSTTCATGGT (oligo3f) (SEQ ID N°18)
	ACCATGAASSWCCASGCCTG (oligo3r) (SEQ ID N°19)

X : acide aminé indéterminé. (R = A or G; S = C or G; Y = C or T and W = A or T).

La comparaison des masses expérimentale et théorique du polypeptide correspondant à la séquence SEQ ID N°13 permet l'identification d'un résidu tryptophane en position 3. Les séquences soulignées et en gras ont été utilisées pour concevoir 6 oligonucléotides dégénérés, sens (1f, 2f et 3f) et antisens (1r, 2r et 3r), en fonction de l'utilisation typique des codons chez *Streptomyces*. En l'absence d'informations sur la position respective des polypeptides dans la séquence protéique, une combinaison des six oligonucléotides a été utilisée pour le clonage. Les conditions de PCR testées conduisant à un nombre de fragments nucléotidiques amplifiés trop important, une stratégie de transcription inverse (RT-PCR) a été développée.

- Amplification d'un fragment oligonucléotidique par RT-PCR :

L'ARN total de *Streptomyces noursei* a été extrait à partir d'une culture de 24 heures en milieu 5 (milieu ATCC) selon le protocole décrit par Kieser et al. (Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation Norwich, U.K. (2000)). Un traitement supplémentaire à la DNase I permet d'éliminer complètement l'ADN. Les oligonucléotides dégénérés (sens et antisens) ont été synthétisés par Sigma Genosys Ltd et la RT-PCR a été réalisée en utilisant le kit Titan™ One Tube RT-PCR (Boehringer Mannheim) selon les instructions standard, avec 1 µg d'ARN total pour chaque réaction. La transcription inverse est réalisée à 50 °C pendant 30 minutes, puis les conditions de PCR sont les suivantes : dénaturation initiale à 97 °C pendant 4 min, suivie de 45 cycles de 1 min à 95 °C, 1 min à 50 °C et 1 min à 68 °C, et

la réaction finale de polymérisation à 68 °C pendant 10 minutes. Les produits de réaction sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose 1,5 %, puis purifiés (DNA and Gel Band purification kit, Pharmacia).

La RT-PCR avec les six combinaisons d'oligonucléotides a conduit à l'amplification d'un fragment unique d'environ 400 paires de bases avec les oligonucléotides 3f et 2r. Ce fragment a été cloné dans le vecteur pGEM-T easy vector et séquencé, permettant de confirmer que les amorces oligonucléotidiques utilisées sont bien dans le même cadre de lecture. Ce fragment nucléotidique a été utilisé comme sonde pour cribler une librairie d'ADN génomique de *Streptomyces noursei*, préparée dans le cosmide pWED1.

- Construction d'une librairie d'ADN génomique de *Streptomyces noursei* :

L'ADN génomique (2.5 µg), extrait de *Streptomyces noursei* selon les procédures standard (Kieser et al., article précité ; Sambrook J. et al, Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) a été partiellement digéré avec 0,33 U de BamHI, conduisant à des fragments d'ADN d'environ 35 à 45 kb. Ces fragments sont introduits par ligation dans le vecteur cosmidique pWED1 préalablement digéré par BamHI et déphosphorylé. Le produit de ligation a été encapsidé in vitro dans des phages lambda (Packagene Lambda DNA packaging system, Promega) et introduit par transfection dans la souche *E. coli* (SURE).

- Criblage de la librairie d'ADN génomique de *Streptomyces noursei* :

Le fragment nucléotidique amplifié par RT-PCR a été ensuite marqué par amorçage aléatoire avec du [α -³²P]-dCTP en utilisant le kit T7 Quick Prime (Pharmacia) et utilisé comme sonde pour cribler la banque. Environ 2000 clones ont été testés par hybridation sur colonies selon la méthode standard (Sambrook J et al., article précité) et 12 clones ont été sélectionnés. Les cosmides correspondant (notés pSL110 à pSL121) ont été extraits, digérés par BamHI et analysés par la technique de Southern blot en utilisant le fragment de RT-PCR comme sonde. Cette sonde a permis d'isoler un fragment nucléotidique de 3.8kb, commun à tous les cosmides et également présent dans l'ADN génomique de *Streptomyces noursei* digéré

par BamHI. Ce fragment BamHI a été isolé à partir du cosmide pSL117 et cloné dans le vecteur pBC SK+, pour donner le vecteur pSL122 (Définition des vecteurs utilisés : cf. Tableau II).

EXEMPLE 2 : Analyse de la séquence du polynucléotide
de l'Invention

Le séquençage automatique des polynucléotides de l'Invention a été réalisé sur un analyseur ABI PRISM Genetic Analyzer (Perkin Elmer) en utilisant le kit DYEnamic ET terminator cycles (Pharmacia) ou par la société Genome Express. L'analyse informatique des séquences et les comparaisons avec les banques de données ont été réalisées avec les programmes Frame (Bibb, M.J. et al. Gene, 30, 157-166 (1984)), BLAST et FASTA (Altschul, S. F. et al., Nucleic Acids Res., 25, 3389-3402 (1997); Pearson, W. R., Methods in Enzymology, 183, 63-98 (1990)).

L'analyse par le programme FRAME du polynucléotide BamHI (SEQ ID N°5), fait apparaître quatre phases de lecture ouvertes complètes, notées orf1 à orf4, (albA à albD, SEQ ID N°1 à 4) transcrites dans la même direction, et une phase ouverte de lecture (1119 bp) dont l'extrémité est tronquée, notée orf5 (voir Figure 2). Le produit de traduction de orf5 présente un très fort degré de similitude avec la partie N-terminale d'une glutamate déshydrogenase NADP-spécifique de Streptomyces coelicolor (78 % d'identité et 86 % de similitude selon le programme BLAST).

La première des phases ouvertes de lecture, orf1 (albA, SEQ ID N°1), contient la séquence nucléotidique du fragment amplifié par RT-PCR, et la séquence peptidique déduite contient bien la séquence des 3 peptides tryptiques initialement isolés. Le produit de orf1 correspond par conséquent à la protéine enzymatique de masse d'environ 21 kDa isolée et purifiée de Streptomyces noursei (Gondry M. et al.; article précité). Par conséquent ce gène est bien impliqué dans la biosynthèse de l'albonoursine et sera désigné par albA.

L'analyse de la séquence de albA (orf1) indique que 3 codons, deux GUG et un AUG, pourraient être considérés comme codons d'initiation pour la traduction d'albA, ce qui aboutirait à des protéines de 219, 204 ou 196 aminoacides. Des tentatives de détermination de la séquence peptidique N-terminale ayant échouées du fait de la présence d'une modification post-traductionnelle sur cette extrémité, la séquence la plus

longue (657 nucléotides) a été retenue pour albA (SEQ ID N°6). (Le premier codon d'initiation est situé à 20 nucléotides de distance de l'extrémité du fragment BamHI qui, par conséquent, ne contient pas la région promotrice qui doit se situer plus en amont de ce gène.)

5 La comparaison de la séquence peptidique déduite de albA (AlbA, SEQ ID N°6) avec les bases de données a montré un degré de similitude maximal avec une NADH oxydase de *Archaeoglobus fulgidus* (32% d'identité et 52 % de similitude selon le programme BLAST) et la recherche de domaines conservés indique qu'il présente un large domaine de type
10 nitroréductase (pfam00881, 151 aminoacides).

 Contigu à albA, mais en décalage de cadre de lecture, orf2 (albB, SEQ ID N°2) présente également l'utilisation typique des codons de *Streptomyces*. albB est traduit sous deux isoformes (AlbB₁, SEQ ID N°7 et AlbB₂, SEQ ID N° 8) nécessaires à l'activité du polypeptide AlbA, selon le
15 codon d'initiation, AUG ou GUG, pris en considération pour orf2. Les deux isoformes d'AlbB qui sont exprimées en quantité à peu près équivalentes, se différencient par la présence de 5 acides aminés supplémentaires localisés à l'extrémité N-terminale d'AlbB₁ et résultant de l'utilisation de deux codons d'initiation différents. Dans le cas d'AlbB₁, la méthionine initiale est éliminée.

20 Les 2 possibilités sont compatibles avec l'analyse de la séquence avec le programme FRAME. Les programmes BLAST et FASTA ne révèlent aucune homologie particulière entre la séquence peptidique déduite de orf2 et les protéines des banques de données.

 De la même façon, les recherches dans les banques de
25 données réalisées à partir des séquences polypeptidiques, déduites respectivement de orf3 (albC, SEQ ID N°3) et orf4 (albD, SEQ ID N°4) ne révèlent aucune homologie significative avec une protéine de fonction connue. orf3 débute par un codon d'initiation ATG et code pour un polypeptide de 239 acides aminés, AlbC (SEQ ID N°9) qui présente un faible degré de similitude
30 avec deux protéines hypothétiques de fonction inconnue : Rv2275 de *Mycobacterium tuberculosis* (34 % d'identité et 53 % de similitude selon le programme BLAST) et YvmC de *Bacillus subtilis* (29 % d'identité et 46 % de similitude selon BLAST). Orf4 code pour une protéine de 277 acides aminés, Albe (SEQ ID N°10) qui comprend un domaine membranaire, comme l'indique
35 l'analyse de sa séquence avec le programme TMHMM (Krogh, A. et al., J.

Mol. Biol. 305, (2001), et présente une faible homologie avec une protéine membranaire de fonction inconnue de *Streptomyces coelicolor* (54 % d'identité et 67 % de similitude selon BLAST).

EXEMPLE 3 : Clonage des polynucléotides albA, albB, albC et albD et construction des vecteurs d'expression

Les procédés d'extraction et de préparation d'ADN, de transformation des souches *Escherichia coli* et *Streptomyces lividans* TK 21, de préparation des protoplastes ont été réalisés selon les protocoles standard décrits par Sambrook et al. (article précité) et Kieser et al. (article précité).

L'ensemble des vecteurs plasmidiques et cosmiques préparés pour manipuler les polynucléotides faisant l'objet de la présente Invention sont présentés dans le Tableau II (voir aussi Figure 4).

Tableau II : Souches et vecteurs utilisés

Bactéries	Propriétés	Source/référence
<i>E. coli</i> DH5 α	souche standard pour le clonage	Invitrogen
<i>E. coli</i> SURE	souche utilisée pour les bibliothèques de cosmides	Stratagene
<i>Streptomyces lividans</i> TK21	souche <i>Streptomyces</i> pour le clonage des gènes alb	Hopwood, D. A. et al. J. Gen. Microbiol. 129, 2257-2269 (1983).
<i>Streptomyces noursei</i> ATCC 1145	souche sauvage produisant l'albonoursine	ATCC
Vecteurs		
pGEM-T easy	Vecteur de clonage des produits de PCR, Amp ^R	Promega
pWED1	Vecteur cosmique dérivé de pWE15, Amp ^R	Gourmelen, A. et al., Antimicrobial Agents Chemotherapy, 42, 2612-2619 (1998)
pBC SK ⁺	Vecteur de clonage, Cm ^R	Stratagene
pHP45 Ω aac	Plasmide utilisé comme source pour	Blondelet-Rouault, M. H. et al., Gene,

	la cassette Ω aac, Amp ^R , Apr ^R	190, 315-317 (1997).
pUWL201	Vecteur navette E. coli/Streptomyces, contient le promoteur ErmE* pour l'expression des gènes clonés dans Streptomyces. Amp ^R , Thio ^R	Doumith, M., et al., Mol. Gen. Genet. 264, 477-485 (2000)
pET-28a	Vecteur d'expression	Novagen
pSL117	Cosmide de la librairie de Streptomyces noursei, utilisé pour les produits de RT-PCR	
pSL122	Fragment BamHI de 3.8 kb, cloné dans pBC SK ⁺	
pSL127	Dérivé de pSL122, comprenant une délétion interne du fragment ApaI, supprimant orf2, orf3, orf4 et orf5.	
pSL128	Fragment BamHI de 3.8 kb de pSL122, cloné dans pUWL201, sous le contrôle de ErmE*p.	
pSL129	Fragment BamHI de 3.8 kb de pSL122, cloné dans pUWL201, contenant l'insertion dans la direction opposée à pSL128.	
pSL138	Dérivé de pSL122, comprenant une délétion interne du fragment EcoRI, supprimant orf3, orf4 et orf5, et avec insertion de la cassette Ω aac.	
pSL140	Dérivé de pSL122, comprenant une délétion interne du fragment NdeI/EcoRV supprimant orf5, et avec insertion de la cassette Ω aac.	
pSL142	Fragment Asp718/Klenow/BamHI de pSL138 (contenant orf1, orf2, et la cassette Ω aac) cloné dans pUWL201.	
pSL144	Fragment Asp718/Klenow/BamHI de pSL140 (contenant orf1 à orf4 et la cassette Ω aac) cloné dans pUWL201.	
pSL145	Dérivé de pSL122 avec délétion interne du fragment EcoRI,	

	supprimant orf3, orf4 et orf5	
pSL150	Produit de PCR de l'amplification de orf1-orf2, cloné dans le vecteur d'expression pET-28a.	
pSL157	Produit de PCR de l'amplification de orf4, cloné dans pGEM-T easy.	
pSL159	Fragment PstI/Klenow/BamHI de pSL157 cloné dans pUWL201.	
pSL165	Produit de PCR de l'amplification de orf3 cloné dans pGEM-T easy.	
pSL166	Produit de PCR de l'amplification de orf3 + orf4 cloné dans pGEM-T easy.	
pSL167	Fragment PstI/Klenow/BamHI de pSL166 cloné dans pUWL201	
pSL168	Fragment PstI/Klenow/BamHI de pSL165 cloné dans pUWL201	

pSL117 est un cosmide contenant la librairie d'ADN génomique de *Streptomyces noursei*.

5 pSL122 contient le polynucléotide BamHI (SEQ ID N°5) de 3,8 kb de *Streptomyces noursei* faisant l'objet de l'invention, cloné dans le vecteur de clonage pBC SK⁺. pSL127 et pSL145 ont été construits respectivement par digestion de pSL122 par ApaI ou EcoRI, et religation.

10 Le polynucléotide BamHI a également été cloné dans le vecteur navette *E. coli* / *Streptomyces* pUWL201, dans l'orientation adéquate pour avoir tous les gènes sous le contrôle du promoteur ermE* (pSL128) ou bien dans l'orientation opposée (pSL129).

15 pSL142 et pSL144 ont été construits en 2 étapes : pSL122 a d'abord été digéré par EcoRI et l'enzyme de Klenow ou NdeI et l'enzyme de Klenow, puis une ligation entre ces fragments et la cassette Ω aac digérée par HindIII-Klenow conduit aux plasmides pSL138 et pSL140. Ces plasmides sont ensuite digérés par Asp718, Klenow et BamHI, et les fragments obtenus contenant orf1 (albA, SEQ ID N°1), orf2 (albB, SEQ ID N°2) et la cassette Ω aac, pour le premier, et orf1 à orf4 (albA à albD) et la cassette Ω aac, pour le second, sont clonés dans le vecteur pUWL201 digéré par XbaI-Klenow-
20 BamHI.

orf3 (albC, SEQ ID N°3), orf4 (albD, SEQ ID N°4) et (orf3+orf4) sont amplifiées par PCR en utilisant les amorces suivantes :

pour orf3

sylv24 : (SEQ ID N°20) :

5 5'-CGGCTGCAGGAGAAGGGAGCGGACATATGCTTGCAGGCTTAGTTCCC
-3', (site PstI souligné) ;

sylv22 : (SEQ ID N°21) :

5'-CGGTCCCGTGGATCCAAGCTTCTAGGCCGCGTCGGCCAGCTC-3', (site BamHI souligné) ;

10 pour orf4

sylv19 : (SEQ ID N°22) :

5'-GAGCGGGATCCTGCAGTGTCATGGGGAGGACAGGAC-3', (site PstI souligné) ;

sylv18 : (SEQ ID N°23) :

15 5'-CGATCACGTGGATCCAAGCTTGCCAATCCTGTACGCGATTT-3', (site BamHI souligné) ;

pour (orf3+orf4) : sylv24 et sylv18.

orf2 et orf3 étant séparés seulement de 37 nucléotides, un site synthétique de liaison au ribosome a été inclus dans sylv24 afin d'assurer une bonne traduction de orf3. Les fragments amplifiés par PCR ont ensuite été clonés dans le vecteur pGEM-T easy (Promega) pour donner pSL165, pSL157 et pSL166. Les fragments PstI-BamHI obtenus à partir de ces trois plasmides ont ensuite été clonés dans le vecteur pUWL201 digéré par PstI-BamHI pour donner pSL168, pSL159 et pSL167.

25 **EXEMPLE 4 : production du dérivé de dicétopipérazine cyclo(Δ Phe- Δ Leu) (albonoursine) chez un hôte hétérologue, *Streptomyces lividans*, transformé par introduction du polynucléotide BamHI (SEQ ID N°5).**

30 Des protoplastes de *Streptomyces lividans* TK21 ont été transformés par pSL128 (contenant le polynucléotide BamHI (SEQ ID N°5)), pSL129 ou pUWL201 (contrôle) selon les protocoles standard décrits par Sambrook et al. (article précité) et Kieser et al. (article précité). La culture des

trois souches a été réalisée en milieu M5 (milieu ATCC), milieu riche contenant un large excès d'acides aminés, pendant 3 jours à une température comprise entre 28 et 30°C. Les surnageants de cultures des 3 souches transformées ont été analysées par HPLC en phase inverse dans les conditions suivantes : le surnageant des cultures (500 µl) a été filtré (ultrafree-MC 10 kDa, Millipore) et injecté directement en HPLC (colonne C18 (4.6 x 250 mm) Vydac : débit : 1 ml/min ; élution : gradient linéaire de 0 à 45% d'acétonitrile dans 0,1 % d'acide trifluoroacétique en 45 minutes. L'élution a été suivie à l'aide d'un détecteur multi-longueur d'onde entre 200 et 600 nm.

On détecte chez *S. lividans*[pSL128] la production d'albonoursine sous 2 formes stéréoisomériques (2 pics à 38,3 min et 40,5 min ; $\lambda_{\max} = 318 \text{ nm}$; $m = 256,4 \text{ Da}$). (Figure 5A)

Dans les souches contrôles *S. lividans*[pUWL201] et *S. lividans*[pSL129] (Figure 5B et 5C) on ne détecte aucune production d'albonoursine.

Le polynucléotide BamHI (SEQ ID N°5) de *Streptomyces noursei* contient l'ensemble de l'information génétique pour la production d'albonoursine.

EXEMPLE 5 : mise en évidence de la fonction des polynucléotides albA et albB par visualisation de la conversion de cyclo(L-Trp-L-Trp) en cyclo(Δ Trp- Δ Trp) sur boîte de Petri à partir d'un hôte hétérologue, *Escherichia coli*, transformé par insertion des polynucléotides albA et albB.

Un test rapide sur boîte de Petri a été mis au point pour détecter directement la conversion de cyclodipeptides en bis-déshydro-cyclodipeptides sur colonies isolées. Ce test repose sur la conversion du cyclodipeptide, incolore en solution cyclo(L-Trp-L-Trp), en un produit jaune et insoluble cyclo(Δ Trp- Δ Trp) ($\lambda_{\max} = 367 \text{ nm}$ et 450 nm), conférant une couleur jaune vif aux colonies présentant l'activité CDO.

Les souches *E. coli*, transformées avec les plasmides préparés selon le protocole détaillé à l'exemple 3, ont été testées directement sur boîte de milieu LB contenant 0,5 mM de cyclo(L-Trp-L-Trp).

Après 16 heures d'incubation à 37°C, les souches *E. coli*[pSL122] (contenant le polynucléotide BamHI) et *E. coli*[pSL145]

(contenant le fragment BamH1 avec une délétion de orf3 à orf5) présentent une coloration jaune intense, alors que *E. coli*[pBC SK+] (contenant le vecteur de clonage intact) et *E. coli*[pSL127] (contenant le fragment BamH1 avec une délétion de orf2 à orf5) ne sont pas colorées.

5 Ce résultat démontre l'implication des deux gènes orf1 (albA, SEQ ID N°1) et orf2 (albB, SEQ ID N° 2), dans l'activité cyclodipeptide oxydase associée à la production d'albonoursine.

EXEMPLE 6 : Expression de l'activité enzymatique cyclodipeptide oxydase (CDO) chez un hôte hétérologue, *Streptomyces lividans*, transformé par introduction de orf1 et orf2 (albA et albB, SEQ ID N° 1 et SEQ ID N°2).

L'analyse par HPLC du surnageant de culture de la souche *Streptomyces lividans* TK21, transformée par le plasmide pSL142 contenant le polynucléotide BamH1 délété de orf3 (albC, SEQ ID N°3), orf4 (albD, SEQ ID N°4) et orf5, dans les conditions de culture décrites à l'exemple 4, démontre l'absence de production d'albonoursine, et indique donc l'implication de orf3 et/ou orf4 dans la production du dérivé de dicétopipérazine.

Pourtant, l'addition dans le surnageant de cyclo(L-Phe-L-Leu), dans les conditions standard décrites dans Gondry et al. (article précité), aboutit bien à la production d'albonoursine. Ceci suggère l'implication de orf3 et/ou orf4 dans la biosynthèse du cyclodipeptide cyclo(L-Phe-L-Leu).

EXEMPLE 7 : mise en évidence de la production de cyclo(L-Phe-L-Leu) et cyclo(L-Phe-L-Phe) in vivo chez un hôte hétérologue, *Streptomyces lividans*, transformé par introduction de orf3 (albC, SEQ ID N°3)

Pour confirmer les résultats décrits dans l'exemple 6, orf3 (albC) et orf4 (albD) ont été clonés séparément dans le plasmide navette pUWL201, donnant respectivement pSL168 (orf3) et pSL159 (orf4), qui ont été introduits dans *Streptomyces lividans* TK21 selon les protocoles standard décrits par Sambrook et al. (article précité) et Kieser et al. (article précité).

Après culture dans les conditions décrites à l'exemple 4, les surnageants de culture de *S. lividans*[pSL168] et *S. lividans*[pSL159] ont été analysés par HPLC, dans les conditions standard décrites dans l'exemple 4, afin de mettre en évidence la production du cyclodipeptide cyclo(L-Phe-L-Leu).

La détection directe de ce composé étant difficile du fait de son faible coefficient d'absorption molaire ($\epsilon_{\text{mol}} \approx 200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 254 nm) et de la complexité du milieu, sa mise en évidence a été réalisée après conversion du cyclodipeptide en albonoursine (cyclo(Δ Phe- Δ Leu), $\epsilon_{\text{mol}} = 25120 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 318 nm), par addition de l'enzyme CDO purifiée selon le procédé décrit dans Gondry et al. (article précité).

Les surnageants de culture ont été filtrés, puis incubés pendant 10 à 15 heures à 30°C avec 4.1×10^{-3} unités enzymatiques de CDO purifiée. L'analyse HPLC comparée des surnageants de culture, incubés ou non avec CDO, a été réalisée. La masse moléculaire des métabolites produits a été déterminée par spectrométrie de masse (Quattro II, Micromass).

Les résultats sont présentés sur la Figure 6 :

On détecte dans le surnageant de culture de *S. lividans*[pSL168], incubée en présence de CDO, de l'albonoursine (cyclo(Δ Phe- Δ Leu)) (pic à 40,5 min ; $\lambda_{\text{max}} = 318 \text{ nm}$; $m = 256,4 \text{ Da}$) et du cyclo(Δ Phe- Δ Phe) (pic à 44,1 min ; $\lambda_{\text{max}} = 338 \text{ nm}$; $m = 290,3$) (panneau A) ;

Aucun métabolite n'est détecté :

- dans le surnageant de culture de *S. lividans*[pSL168] en absence de CDO (panneau B) ;
- dans le surnageant de culture de *S. lividans*[pSL159] en absence ou en présence de CDO (panneau C) ;
- dans le surnageant de culture de *Streptomyces lividans* TK21 incubée en présence de CDO : (panneau D).

Ce résultat démontre clairement l'implication de orf3 (albC) dans la production des cyclodipeptides cyclo(L-Phe-L-Leu), précurseur de l'albonoursine, et cyclo(L-Phe-L-Phe), précurseur d'un second métabolite, cyclo(Δ Phe- Δ Phe), produit conjointement au premier chez *Streptomyces noursei* (Khokhlov A.S. et al., Tetrahedron Lett., 27, 1881 (1963)) .

EXEMPLE 8 : mise en évidence de la production de cyclo(L-Phe-L-Leu) et cyclo(L-Phe-L-Phe) in vivo chez un hôte hétérologue, *Streptomyces lividans*, transformé par introduction du polynucléotide orf3-orf4 (albC-albD, SEQ ID N°3 - SEQ ID N°4)

Selon une variante de l'exemple 7, le polynucléotide orf3-orf4 (albC-albD) a été cloné dans le plasmide navette pUWL201 et le plasmide résultant, pSL167, a été introduit dans *Streptomyces lividans* TK21 selon les protocoles standard décrits par Sambrook et al. (article précité) et Kieser et al. (article précité).

L'analyse HPLC du surnageant de culture, traité de façon identique au procédé décrit dans l'exemple 7, montre que l'on détecte dans le surnageant de culture de *S. lividans*[pSL167] incubée en présence de CDO de l'albonoursine (cyclo(Δ Phe- Δ Leu)) et du cyclo(Δ Phe- Δ Phe) et qu'aucun métabolite n'est détecté dans le surnageant de culture de *S. lividans*[pSL167] en absence de CDO, ni dans le surnageant de culture de *Streptomyces lividans* TK21 incubée en présence de CDO.

Ces résultats démontrent que le produit du gène orf5 ne participe pas directement à la biosynthèse de l'albonoursine, tandis que orf4, (albC), est nécessaire et suffisante pour produire les cyclodipeptides précurseurs cyclo(L-Phe-L-Leu) et cyclo(L-Phe-L-Phe), chez *Streptomyces lividans* comme chez *Streptomyces noursei*.

EXEMPLE 9 : surexpression de AlbA et AlbB à partir du polynucléotide albA-albB (SEQ ID N° 1-SEQ ID N°2)

Le vecteur pET-28a(+), qui contient une séquence N-terminale ou C-terminale poly-histidine (His-tag), a été utilisé pour la construction d'un vecteur d'expression contenant le polynucléotide albA-albB, afin de faciliter la purification de la protéine recombinante. La séquence la plus courte de albA, codant pour un polypeptide de 196 résidus d'acides aminés, a été choisie. L'amplification génique du polynucléotide par PCR a été réalisée en utilisant des amorces oligonucléotidiques conçues pour inclure un site de clonage NdeI (sens) et XhoI (antisens).

Les conditions de PCR sont les suivantes : dénaturation initiale à 94 °C pendant 4 min suivie de 10 cycles d'1 minute à 94 °C, 1 minute à 45 °C et 1,5 min à 72 °C, puis par 20 cycles d'1 minute à 94 °C, 1 minute à 50 °C et 1,5 min à 72 °C, et une réaction de polymérisation finale à 72 °C pendant 10 min. Les produits de réaction ont été digérés par NdeI et XhoI, et les fragments sous-clonés dans le vecteur pET-28a pour donner pSL150. La séquence de l'insert a été contrôlée par séquençage automatique (ABI PRISM

Genetic analyzer, Perkin Elmer) en utilisant le kit DYEnamic ET terminator cycles (Amersham Pharmacia Biotech).

Des conditions standard d'expression ont été utilisées :

- température de croissance : 20 °C,
- 5 - induction de l'expression : 0,6 mM IPTG
- durée de l'induction : 16 heures.

pSL150 a été introduit dans E. coli BL21(DE3)-plysS. La souche a été cultivée en milieu LB à 20 °C jusqu'à une absorbance de 0.6, puis l'expression est induite. La culture est alors centrifugée à 4190 g, à 4 °C pendant 15 min. Les cellules ont été remises en suspension en tampon d'extraction (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 µM phosphoramidon, 1 mM PMSF et 5 % glycérol), et broyées avec une presse d'Eaton. L'extrait protéique est incubé en présence de benzonase (25 U/ml) à 30 °C pendant 10 min, puis centrifugé à 11300 g pendant 15 min à 4 °C. L'activité enzymatique a été déterminée selon le test standard décrit par Gondry et al. (article précité). Une unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme catalysant la production d'1 µmole de produit par minute, et l'activité spécifique est exprimée en unités d'enzyme par mg de protéines. L'activité spécifique de l'extrait enzymatique est augmentée d'un facteur 50 (As = 2 U/mg) après purification par chromatographie d'affinité (colonne : HiTrap chelating HP (1 ml), Amersham Pharmacia Biotech ; équilibration en ions Ni²⁺ en tampon 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,5 M NaCl et 10 mM imidazole ; élution : gradient de 0,3 à 1 M imidazole en 35 min ; débit : 1 ml/min).

L'analyse par gel de polyacrylamide / sodium dodécylsulfate (SDS-PAGE) (12 %) de la fraction purifiée de E. coli[pSL150] (Figure 7) démontre la présence simultanée de AlbA et AlbB en proportions non stœchiométriques, et démontre que AlbB est exprimée sous 2 isoformes (2 bandes en SDS-PAGE). L'analyse de AlbB purifiée par spectrométrie de masse et séquençage N-terminal de la séquence polypeptidique indique que ces deux formes correspondent aux produits AlbB₁ et AlbB₂ à partir des 2 codons d'initiation identifiés dans sa séquence (cf. ci-dessus).

EXEMPLE 10 : conversion in vitro de cyclo(L-Phe-L-His) et cyclo(L-Phe-L-Leu) par AlbA-AlbB recombinant

La préparation enzymatique purifiée selon le procédé décrit dans l'exemple 9, incubée dans les conditions standard telles que décrites par Gondry et al. (article précité), catalyse la conversion in vitro de cyclodipeptides en monodéshydro- et bisdéshydro-cyclodipeptides.

5 La préparation enzymatique purifiée a été incubée en présence des substrats cyclo(L-Phe-L-His) et pendant 72 h à 30 °C. Les produits de la réaction ont été analysés par HPLC en phase inverse dans les conditions décrites dans l'exemple 4, et identifiés sur la base de leurs caractéristiques spectrales et de leur masse moléculaire confirmée par spectrométrie de masse. Les produits de la réaction sont les suivants :

- à partir de cyclo(L-Phe-L-His) : cyclo(Δ Phe-L-His)at (λ_{\max} = 297 nm et m = 282 Da) et cyclo(Δ Phe- Δ His) (λ_{\max} = 338 nm et m = 280 Da)
- à partir de cyclo(L-Phe-L-Leu) : cyclo(Δ Phe-L-Leu) (λ_{\max} = 297 nm et m = 258 Da) et cyclo(Δ Phe- Δ Leu) (λ_{\max} = 316 nm et m = 256 Da)

15 Ces résultats confirment que la préparation enzymatique obtenue à partir du clonage du polynucléotide albA-albB dans un vecteur d'expression introduit chez un hôte hétérologue catalyse in vitro la conversion de cyclodipeptides en dérivés α,β -déshydrogénés des dicétopipérazines.

REVENDICATIONS

1. Polynucléotide isolé, naturel ou synthétique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les trois phases ouvertes de lecture correspondant aux séquences SEQ ID N°1, SEQ ID N° 2 et SEQ ID N°3.
5
2. Polynucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend en outre la phase ouverte de lecture correspondant à la séquence SEQ ID N°4.
3. Polynucléotide isolé, naturel ou synthétique, caractérisé en ce qu'il répond à la séquence SEQ ID N°5.
10
4. Polynucléotide isolé, naturel ou synthétique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'une des trois phases ouvertes de lecture correspondant aux séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 et SEQ ID N° 4.
5. Polynucléotide isolé, naturel ou synthétique, répondant à l'une quelconque des séquences SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N° 4.
15
6. Vecteur, caractérisé en ce qu'il comprend l'un des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.
7. Vecteur selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide, d'un cosmide, d'un chromosome artificiel bactérien (BAC), d'un élément intégratif d'actinobactéries, d'un virus ou encore d'un bactériophage.
20
8. Utilisation de l'un au moins des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou de l'un de ses fragments d'au moins 15 nucléotides ou de l'un des vecteurs selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7 comme sonde.
25
9. Utilisation de l'un au moins des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou de l'un de ses fragments d'au moins 15 nucléotides ou de l'un des vecteurs selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7 comme amorce pour l'amplification de séquences nucléiques.
30
10. Polypeptide isolé, naturel ou synthétique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'une quelconque des séquences SEQ ID NO : 7 à SEQ ID NO : 10.

11. Polypeptide isolé, naturel ou synthétique, caractérisé en ce qu'il répond à l'une quelconque des séquences SEQ ID NO : 7 à SEQ ID NO : 10.
12. Polypeptide isolé, naturel ou synthétique, caractérisé en ce qu'il est codé par l'un des polynucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou l'un des vecteurs selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7.
- ~~13. Utilisation d'un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou d'un vecteur tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 6 ou 7, pour la préparation d'un polypeptide tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 10 à 12.~~
14. Utilisation, particulièrement in vitro, d'au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, seul ou en combinaison, pour la préparation de cyclodipeptides et/ou de dérivés des dicétopipérazines substituées en positions 3 et 6 par des chaînes latérales d'acides aminés α, β -insaturées, particulièrement de l'albonoursine.
15. Utilisation d'au moins un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou d'un vecteur tel que décrit dans l'une quelconque des revendications 6 ou 7, pour la préparation d'un système biologique modifié ou d'un système acellulaire in vitro modifié.
16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que le système biologique modifié est un microorganisme ou un système d'expression hétérologue utilisant comme hôtes des procaryotes ou des eucaryotes.
17. Système biologique modifié, caractérisé en ce qu'il contient au moins l'un des polynucléotides tels que décrits dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, et/ou au moins l'un des vecteurs tels que décrits dans l'une quelconque des revendications 6 ou 7.
18. Système biologique selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il est constitué par un microorganisme ou un système d'expression hétérologue utilisant comme hôtes des procaryotes ou des eucaryotes, ou encore un système acellulaire in vitro.
19. Système biologique selon la revendication 18, caractérisé en ce que le microorganisme est une bactérie telle que *Escherichia coli* ou *Streptomyces lividans*.
20. Système acellulaire in vitro modifié, caractérisé en ce qu'il contient au moins l'un des polynucléotides tels que décrits dans l'une quelconque des

revendications 1 à 5, et/ou au moins l'un des vecteurs tels que décrits dans l'une quelconque des revendications 6 ou 7.

21. Utilisation d'au moins un système biologique modifié selon l'une quelconque des revendications 17 à 19 ou d'un système acellulaire in vitro
5 modifié selon la revendication 20, pour la préparation de cyclodipeptides et/ou de dérivés des dicétopipérazines substituées en position 3 et 6 par des chaînes latérales d'acides aminés α,β -insaturés, particulièrement de l'albonoursine.
22. Procédé de synthèse in vitro de cyclodipeptides, caractérisé en ce que
10 dans une première étape on met en contact, dans des conditions convenables, deux acides aminés, identiques ou différents et le polypeptide AlbC (SEQ ID N°9) et que dans une deuxième étape on purifie le cyclodipeptide obtenu.
23. Procédé de synthèse in vitro d'un dérivé de dicétopipérazine α,β -
15 insaturée, substitué en position 3 et 6 par des chaînes latérales d'acides aminés, caractérisé en ce que dans une première étape on met en contact, dans des conditions convenables, deux acides aminés, identiques ou différents et le polypeptide AlbC (SEQ ID N° 9) et que l'on purifie le cyclodipeptide obtenu et que dans une deuxième étape on met en contact
20 le cyclodipeptide obtenu à la première étape et AlbA (SEQ ID N° 6), AlbB1 (SEQ ID N° 7) et AlbB2 (SEQ ID N° 8) et que l'on purifie le dérivé de dicétopipérazines α,β -insaturé obtenu.
24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le procédé comprend en outre à la deuxième étape le polypeptide AlbD (SEQ ID
25 N°10).
25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que la quantité de polypeptides est comprise entre 0,1 nM et 10 μ M, de préférence entre 10 nM et 1 μ M.
26. Procédé de synthèse d'un cyclodipeptide, caractérisé en ce que dans une
30 première étape on met en contact un système biologique comprenant au moins le polynucléotide albC (SEQ ID N° 3), dans des conditions appropriées à la culture dudit système biologique choisi et que dans une deuxième étape on purifie le cyclodipeptide obtenu.
27. Procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce que le système

biologique comprend en outre le polynucléotide albD (SEQ ID N°4).

- 5 28. Procédé de synthèse d'un dérivé de dicétopipérazines substituées en position 3 et 6 par des chaînes latérales d'acides aminés α,β -insaturées, caractérisé en ce que dans une première étape l'on met en contact dans des conditions appropriées, un système biologique comprenant un polynucléotide comprenant au moins albA, albB, et albC (SEQ ID N°1 à 3), dans des conditions appropriées à la culture dudit système biologique choisi, et que dans une deuxième étape on purifie le dérivé de dicétopipérazines α,β -insaturé obtenu.
- 10 29. Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que le système biologique comprend en outre le polynucléotide albD (SEQ ID N°4).
- 15 30. Procédé selon l'une quelconque des revendications 26 à 29, caractérisé en ce que le système biologique est un microorganisme comme une bactérie telle que *Escherichia coli* ou *Streptomyces lividans* ou tout système d'expression hétérologue connu utilisant comme hôtes des procaryotes ou des eucaryotes, voire un système acellulaire in vitro.
31. Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 30, caractérisé en ce que la quantité d'acides aminés est comprise entre 0,1 mM et 100 mM, de préférence entre 1 mM et 10 mM.

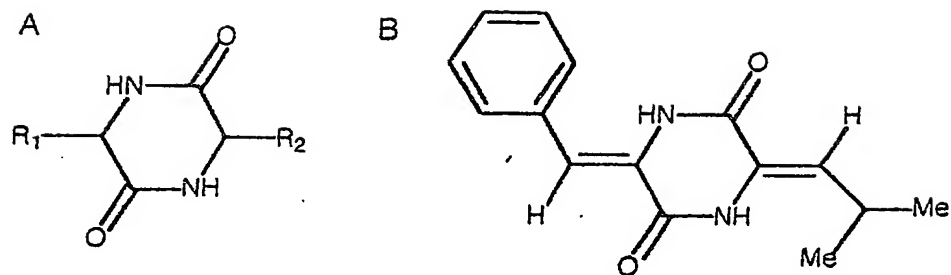


FIGURE 1

pSL125

pSL122

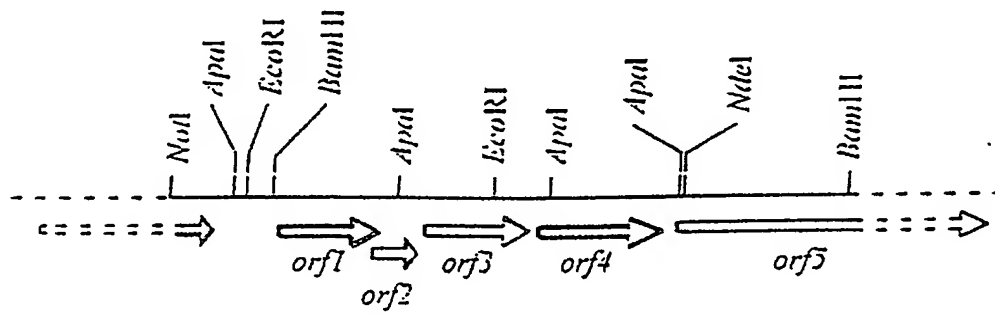


FIGURE 2

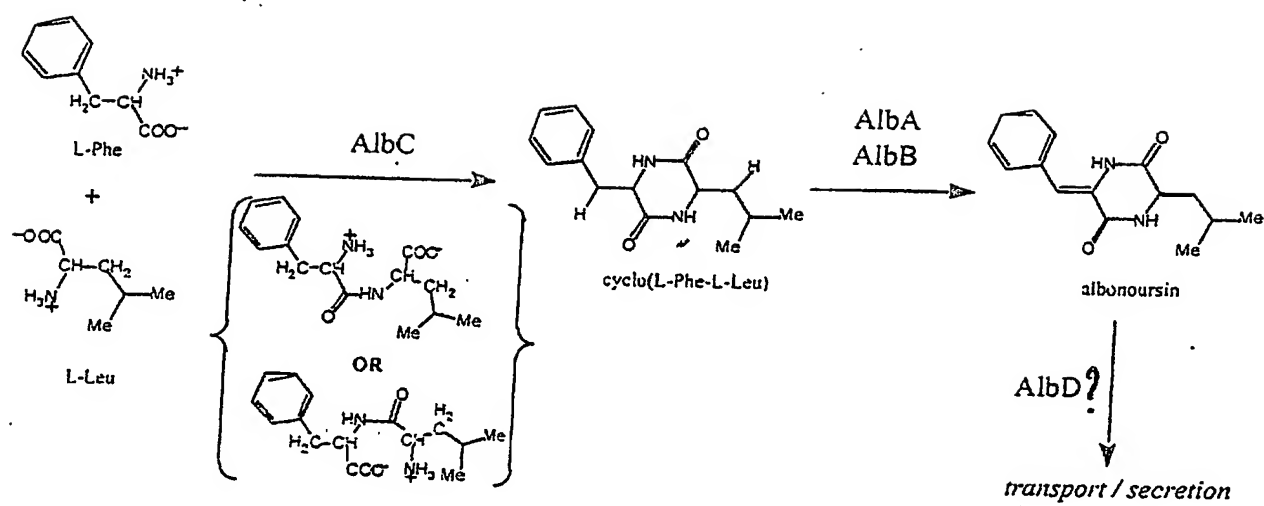
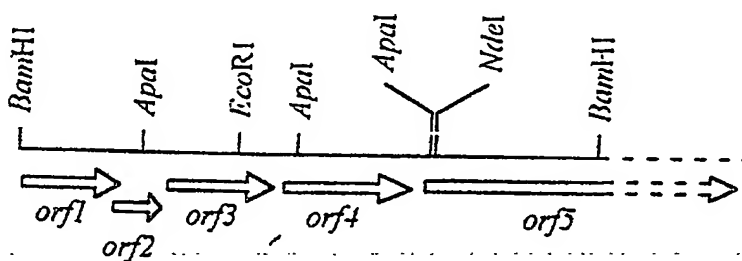
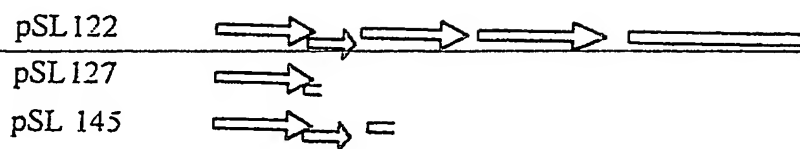


FIGURE 3

Chez *Escherichia coli*



Chez *Streptomyces lividans*

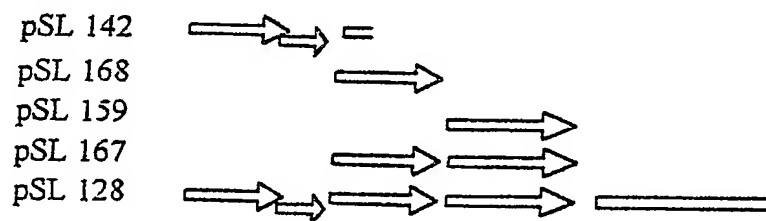


FIGURE 4

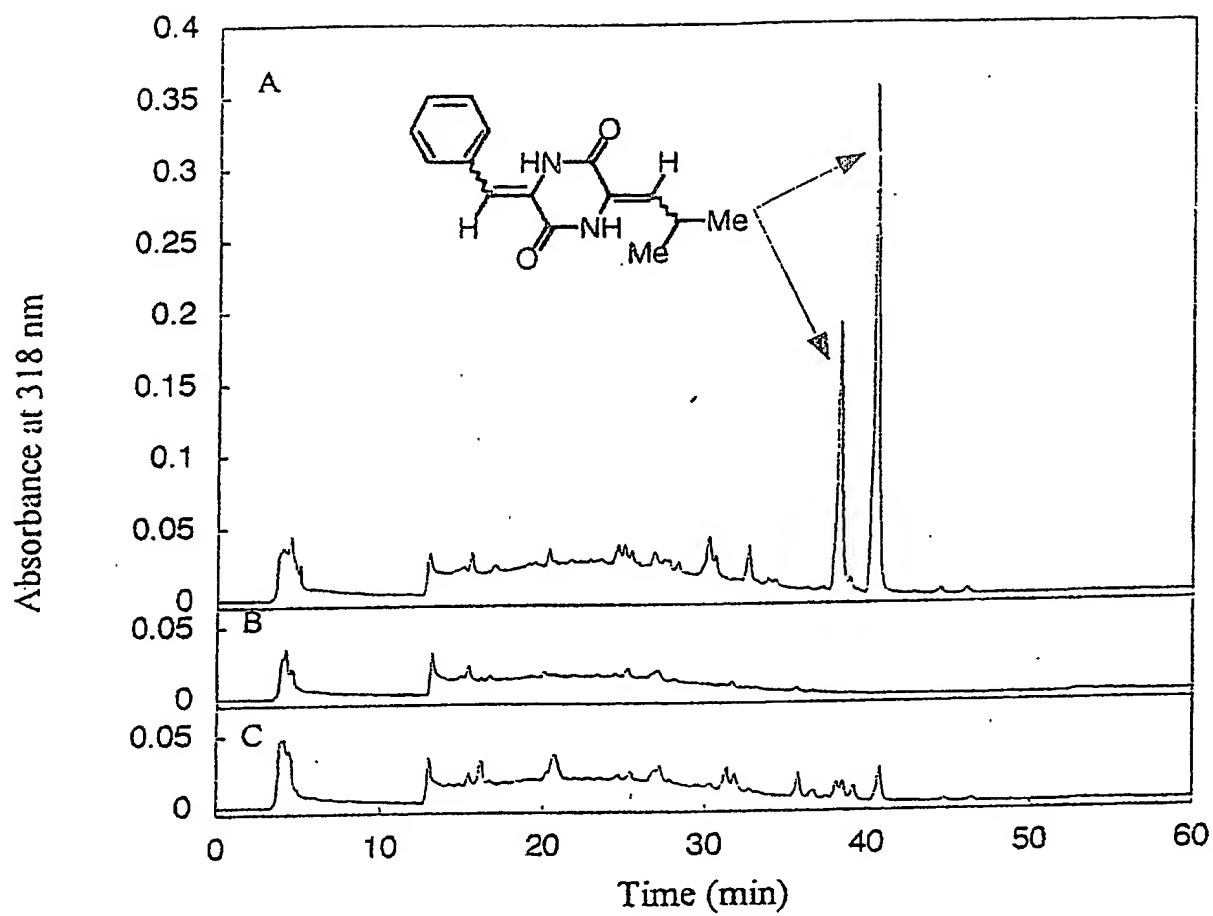


FIGURE 5

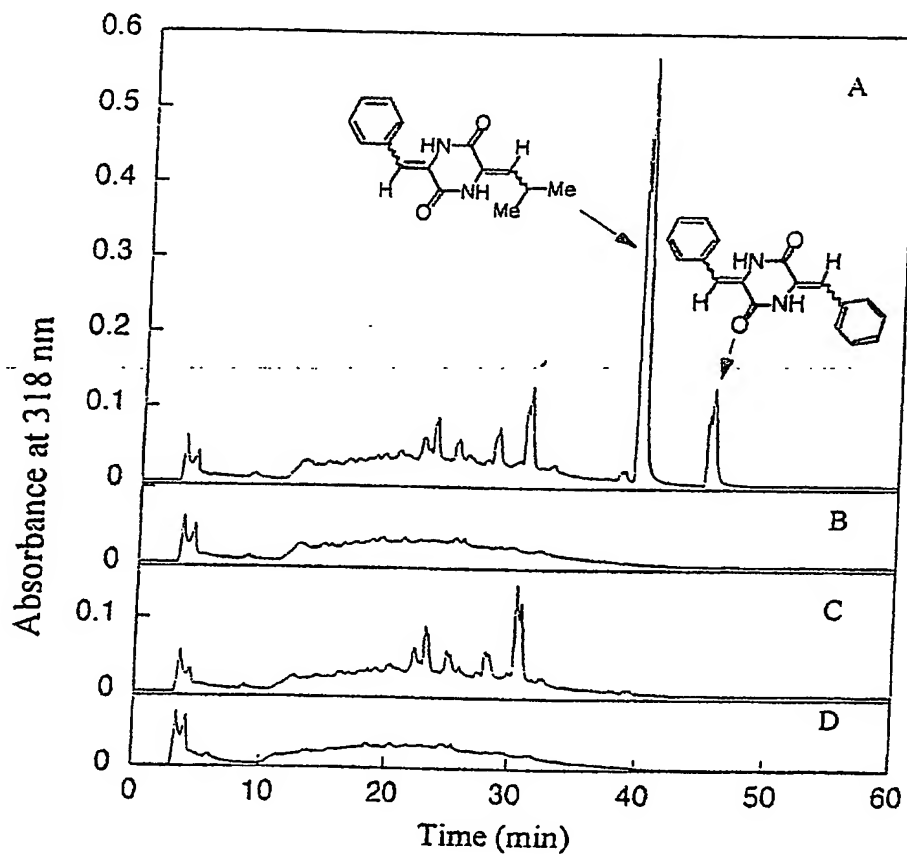


FIGURE 6

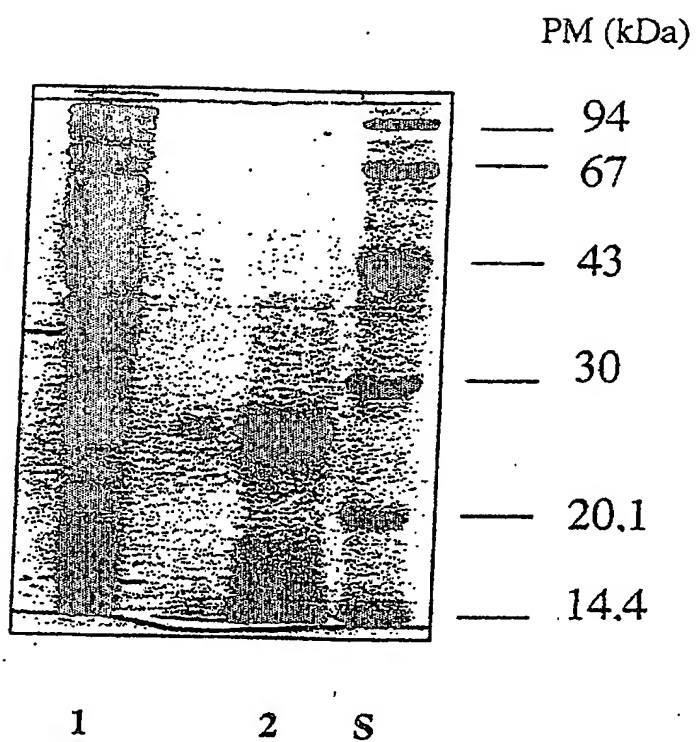


FIGURE 7

LISTE DE SEQUENCES

<110> Commissariat à l'Energie Atomique-CEA
Centre National de la Recherche Scientifique-CNRS

<120> Polynucléotides et polypeptides codés par lesdits
polynucléotides impliqués dans la synthèse de dérivés
des dicétopipérazines

<130> CGA263/83FR

<140>

<141>

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 657

<212> ADN

<213> Streptomyces noursei

<400> 1

```
gtgaggcgcc acccatcgca ttgcgcgtac cgcgggcggt gtgagggtgcg cccaaaaaga 60
aggggattga tgtagctca cagttcatct gaatcgccgc cggaatcctt gccggacgcg 120
tggacgggtcc tcaaaacccg taccgcgcgc cgcaattacg cgaaagagcc ggtagacgac 180
gcgctgatcg agcagctggt ggaggccatg ctgcgcgcgc cgaccgcctc caaccggcag 240
gcgtggtcgt tcatgggtggt gcgcaggccc gccgcgggtcc gccggctgcg cgcgttctcg 300
cccgggggtgc tgggaacccc cgcttcttc gtcgtggcct gcgtcgaccg cagtctgacc 360
gacaacctct cccgaagct ctgcgagaag atctacgaca ccagcaagct ctgtgtcgcc 420
atggcggttg agaacctgct gctcgcggcg cagcgggccg gcctggggcg atgcccggtg 480
ggcagcttca ggtccgacat cgtcaccagc atgctcggtg tcccgggaaca catcgagccg 540
atgctcggtg tcccgatcgg ccgtcccgcg acagccctcg tcccctccca gcgcgcgcgc 600
aagaatgagg tcgtcaacta tgaatcctgg ggaaaccgtg ctgccgcccc aactgcg 657
```

<210> 2

<211> 318

<212> ADN

<213> Streptomyces noursei

<400> 2

```
atgaatcctg gggaaaccgt gctgccgccc caactgcgtg aggagatcgc gctcctcgcc 60
gtctatctgc tcagcagcgg ccgcggactc ctggaggagc cgcccgacta cggaatttac 120
cgctgtaccg acggggcccg tcgggcgctc caactcctcg acgaacacgg cgggagcacg 180
gcacggctga ccgccgtccg cgagcgtctc gacgaggtca tgttcgcgcc gatgggcgag 240
gaccgggaca tgggcgcgat tctggacgac ctgtgtcgcc aaatggcaga cgctcttcgc 300
gaaattgaaa cccctga 318
```

<210> 3

<211> 720

<212> ADN

<213> Streptomyces noursei

<400> 3

atgcttgcag	gcttagttcc	cgcgccggac	cacggaatgc	gggaagaaat	acttggcgac	60
cgagccgat	tgatccggca	acgcggtgag	cacgccctca	tcggaatcag	tgccggcaac	120
agttatttca	gccagaagaa	caccgtcatg	ctgctgcaat	gggccgggca	gcgtttcgag	180
cgacccgatg	tcgtctatgt	cgacacccac	atcgacgaga	tgctgatcgc	cgacggccgc	240
agcgcgacgg	aggccgagcg	gtcgggtcaaa	cgacacgtca	aggatctgcg	gcgcagactc	300
cggcgctcgc	tggagagcgt	ggcgaccac	gccgagcggg	tccgtgtccg	gtccctgtcc	360
gagctccagg	agacccctga	gtaccgggcc	gtacgcgagc	gcaccgaccg	ggccttcgag	420
gaggacgccc	aattcgccac	cgccctgcag	gacatggtgc	gggccgtggt	gatgaaccgg	480
cccgggtgacg	gcgtcggcat	ctccgcggaa	cacctgcggg	ccggtctgaa	ctacgtgctg	540
gccgaggccc	cgctcttcgc	ggactcgccc	ggagtcttct	ccgtccctc	ctcgggtgctc	600
tgctaccaca	tcgacacccc	gatcacggcg	ttcctgtccc	ggcgcgagac	cggtttccgg	660
gcggccgagg	gacaggcgta	cgtcgtcgtc	aggccccagg	agctggccga	cgcgccctag	720

<210> 4

<211> 834

<212> ADN

<213> Streptomyces noursei

<400> 4

atgtcatggg	gaggacagga	cacttgctca	tggtgcggaa	cggggcccct	cggcgaagct	60
gaagacgtag	gaagacagca	cacgtcgcac	gccgggggac	ccgtcatgac	tcaagccgcc	120
accgtcaccg	ccaccacgag	ccagggcagg	gcactcctgc	ggagcctgac	gccgctgttc	180
gtggacgccc	cgatcccgt	cggtcgtac	ttcctcctcg	ccgagggctt	cgccatgagc	240
acgggtcgccg	cgctggcctg	gagcagcgtg	gtcccggcgc	tgcgacgat	ctggggcctg	300
gtccgggagc	ggacgggtcaa	cggcctcgcg	ctgctgatcc	tcgtcgtcaa	cgtaggtggg	360
ctggcgacga	gcaccctgac	cggcgatgcc	cggtgatga	tgccaagga	cagcgccgtc	420
agcagcgtcg	tcgggatcgc	gacccgtgctc	tcggtgcgcg	gccggcgccc	gctgatgacc	480
gccggactcc	ggccctgggt	gaccaaggga	agcccggagg	ggaacgccgc	atgggaccgg	540
ctgtggggcgc	gcagcgcgcg	gttccggcaa	ctggagcggc	gattctcgac	ggctctgggg	600
agcgccctgc	tgatcgagtg	cgtgggtcaag	gtcgtcgggtg	cgtagctcct	gccggtgcac	660
accatggtgt	ggctgggcac	ggtgctgacg	gtgggtggcga	tcctgctggc	catggtggtc	720
gcgggcgggc	gcagcgccga	gccgatggag	cggatggtca	aggccgaggt	cggggcccgc	780
ggcgaggccg	ccacggcggg	gaacgccgag	ccggcgccgg	ccgccgcggc	ctga	834

<210> 5

<211> 3839

<212> ADN

<213> Streptomyces noursei

<400> 5

ggatccgtcc	cgacgggccc	gaaccgggtga	ggcgccaccc	atcgcatctg	ccgtaccgcg	60
gcgggtgtga	ggtgcgccc	aaaagaagg	gattgatgtt	agctcacagt	tcattctgaat	120
cgccgcccga	atccttgccc	gacgcgtgga	cggtcctcaa	aaccggtacc	gccgtccgca	180
attacgcgaa	agagccgggtc	gacgacgcgc	tgatcgagca	gctgttggag	gccatgctcg	240
ccgcgcccga	cgctccaac	cggcaggcgt	ggtcgttcat	ggtggtgcgc	aggcccggcg	300
cgggtccgccc	gctgcgcgcg	ttctcgccc	gggtgctggg	aacccccgcc	ttcttcgctc	360
tgccctgctg	cgaccgcagt	ctgaccgaca	acctctcccc	gaagctctcg	cagaagatct	420
acgacaccag	caagctctgt	gtcgccatgg	cggtggagaa	cctgctgctc	gcggcgacag	480
cggccggcct	ggcggatgc	ccggtgggca	gcttcaggctc	cgacatcgctc	accagcatgc	540
tcgggtatccc	ggaacacatc	gagccgatgc	tcgtggtccc	gatcgccggt	cccgcgacag	600
ccctcgtccc	ctcccagcgc	cgcgccaaga	atgaggtcgt	caactatgaa	tcctggggaa	660
accgtgctgc	cgccccaaact	gcgtgaggag	atcgcgctcc	tcgcccgtcta	tcgtgctcagc	720
agcggccgcg	gactcctgga	ggagccggcc	gactacggaa	tttaccgctg	taccgacggg	780

gcccgctcggg	cgctccaact	cctcgacgaa	cacggcgggg	gcacggcacg	gctgaccgcc	840
gtccgcgagc	gtctcgacga	ggtcatgttc	gcgccgatgg	gcgaggaccg	ggacatgggc	900
gcgattcttg	acgacctgtg	tcgccaaatg	gcagacgctc	ttccggaaat	tgaaaccccc	960
tgacggctgt	ccgggggcaac	cccaaaagga	cttcttagca	tgcttgacag	cttagttccc	1020
gcgcgggacc	acggaatgcg	ggaagaaata	cttggcgacc	gcagccgatt	gatccggcaa	1080
cgcggtgagc	acgccctcat	cggaatcagt	gcgggcaaca	gttatttcag	ccagaagaac	1140
accgtcatgc	tgctgcaatg	ggccgggcag	cgtttcgagc	gcaccgatgt	cgtctatgtc	1200
gacacccaca	tcgacgagat	gctgatcgcc	gacggccgca	gcgcgcagga	ggccgagcgg	1260
tcgggtcaaac	gcacgctcaa	ggatctgcgg	cgcagactcc	ggcgctcgct	ggagagcggt	1320
ggcgaccacg	ccgagcggtt	ccgtgtccgg	tccctgtccg	agctccagga	gacccctgag	1380
taccggggccg	tacgcgagcg	caccgaccgg	gccttcgagg	aggacgccga	attcgccacc	1440
gcctgcgagg	acatggtgcg	ggccgtggtg	atgaaccggc	ccggtgacgg	cgtcggcatc	1500
tccgcggaac	acctgcgggc	cggtctgaac	tacgtgctgg	ccgaggcccc	gctcttcgcg	1560
gactcgcccc	gagtcttctc	cgtccctctc	tcggtgctct	gctaccacat	cgacaccccc	1620
atcacggcgt	tctgttcccc	gcgcgagacc	ggtttccggg	cggccgaggg	acaggcgtac	1680
gtcgtcgtca	ggccccagga	gctggccgac	gcggcctagt	tgggggcgtc	cgcgggcgga	1740
cctgcctccc	cacccgctcc	cggtgccggc	gccgggcatg	acaaatgtca	tggggaggac	1800
aggacacttg	ctcatggtgc	ggaacggggc	ccctcggcga	agctgaagac	gtaggaagac	1860
agcacacgtc	gcacgccggg	ggacccgtca	tgactcaagc	cgccaccgtc	accgccacca	1920
cgagccaggg	cagggcactc	ctgcggagcc	tgacgccgct	gttcgtggac	gccgcgatcc	1980
cgtcggctc	gtacttcctc	ctgcgcgagg	gcttcggcat	gagcacggtc	gccgcgtggg	2040
cctggagcag	cgtggtcccc	gcgctgcgca	cgatctgggg	cctggtccgg	gagcggacgg	2100
tcaacggcct	cgcgctgctg	atcctcgtcg	tcaacgtggt	ggggctggcg	acgagcacc	2160
tgaccggcga	tgcccggctg	atgatggcca	aggacagcgg	cgtcagcagc	gtcgtcggga	2220
tcgcgatcct	gctctcgggt	cgcggccggc	gcccgctgat	gaccgccgga	ctccggccct	2280
gggtgaccaa	gggaagcccc	gaggggaacg	ccgcatggga	ccggctgtgg	gcgcgcagcg	2340
cgcggttccg	gcaactggag	cggcgattct	cgacggtctg	ggggagcgcc	ctgctgatcg	2400
agtgcgtggt	caaggtcgtc	ggtgcgtacg	tcttgccggg	gcacaccatg	gtgtggctgg	2460
gcacggtgct	gacggtgggt	gcgatcctgc	tggccatggt	ggtcgcgggc	ggcggcagcg	2520
ccgagccgat	ggagcggatg	gtcaaggccg	aggtcggggc	cgccggcgag	gccgccacgg	2580
cggggaaacgc	cgagccggcg	ccggccggcg	cggcctgaga	ccgcgcggcg	ggggagttgg	2640
ggaaatcgcg	tacaggattg	gcgcgtcgag	cacccccgcc	ctcgataggg	cgggcccccg	2700
gcgcataatg	tcggcgatgc	gacgggacat	cggagccccg	cgtcgacggt	tcaacggcga	2760
tccggacggc	acgcggcttt	cgtcggccac	gaagggaacg	gaagtcatgt	cgactgttca	2820
cactggggtc	acgcagagcg	gtctcacccg	cgagctggcc	tccctgcacg	ccgagctcgt	2880
ccgtcggaat	cccgggtgaag	cggagttcca	ccaggcggcc	ctggaggtcc	tcgaaacgct	2940
ggcaccgggtg	ctcaccgccc	ggccggagtt	cgccgacgcc	aaggtcctgg	agcggatcgt	3000
cgagccggag	cggcagatca	tgttccgcgt	gccctggcag	gacgactccg	gcacgatccg	3060
ggtcaaccgc	ggcttccggg	tggagttcaa	cagcgcgctc	ggccccata	aggcgggcct	3120
gcggttccac	gcgtccgtca	acctcggcat	cgtgaagttc	ctcggtctcg	agcagatctt	3180
caagaacgcc	ctgaccgggc	tgaacatcgg	cggcggcaag	ggcggcagcg	acttcgaccc	3240
gcacggcagg	tcggacgcgg	aggatgatgc	cttctgccag	tccttcatga	ccgagctgca	3300
ccgtcacctg	ggcgagcaca	ccgacgtgcc	ggctggcgac	atcggcgtcg	gcggccggga	3360
gatcggctac	ctcttcggcc	agtaccggcg	gatcaccaac	cgttgggagg	ccggcgtcct	3420
gaccggcaag	ggcctggcgt	ggggcggtc	caaggcccgt	acggaggcca	ccggttacgg	3480
caatgtgctg	ttcaccgagg	agatgctcaa	gcagcgcggc	gaggagctgg	acggccagca	3540
ggtggtggtc	tccgggtccg	gcaacgtcgc	catctacacc	atcgagaagg	cccaggcgct	3600
cggcgccaac	gtcctgaccg	tctcggactc	cggcggttac	gtcgtcgacg	agaaggcat	3660
cgacctggcg	ctgctcaagc	aggatcaagga	ggtcgagcgc	ggccgggtcg	gcgactacgc	3720
ccagcggcgc	ggcagttcgg	cgaagtacgt	cgcggcgggg	agcgtgtggg	acgtcgcctg	3780
tgacgtggcg	ctgccgtcgg	ccacccagaa	cgagctcgac	gcggacgccg	cccggatcc	3839

<210> 6

<211> 219

<212> PRT

<213> Streptomyces noursei

<400> 6

```

Met Arg Arg His Pro Ser His Ser Pro Tyr Arg Gly Gly Cys Glu Val
 1              5              10              15

Arg Pro Lys Arg Arg Gly Leu Met Leu Ala His Ser Ser Ser Glu Ser
          20              25              30

Pro Pro Glu Ser Leu Pro Asp Ala Trp Thr Val Leu Lys Thr Arg Thr
          35              40              45

Ala Val Arg Asn Tyr Ala Lys Glu Pro Val Asp Asp Ala Leu Ile Glu
          50              55              60

Gln Leu Leu Glu Ala Met Leu Ala Ala Pro Thr Ala Ser Asn Arg Gln
 65              70              75              80

Ala Trp Ser Phe Met Val Val Arg Arg Pro Ala Ala Val Arg Arg Leu
          85              90              95

Arg Ala Phe Ser Pro Gly Val Leu Gly Thr Pro Ala Phe Phe Val Val
          100              105              110

Ala Cys Val Asp Arg Ser Leu Thr Asp Asn Leu Ser Pro Lys Leu Ser
          115              120              125

Gln Lys Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Cys Val Ala Met Ala Val Glu
          130              135              140

Asn Leu Leu Leu Ala Ala His Ala Ala Gly Leu Gly Gly Cys Pro Val
          145              150              155              160

Gly Ser Phe Arg Ser Asp Ile Val Thr Ser Met Leu Gly Ile Pro Glu
          165              170              175

His Ile Glu Pro Met Leu Val Val Pro Ile Gly Arg Pro Ala Thr Ala
          180              185              190

Leu Val Pro Ser Gln Arg Arg Ala Lys Asn Glu Val Val Asn Tyr Glu
          195              200              205

Ser Trp Gly Asn Arg Ala Ala Ala Pro Thr Ala
          210              215

```

<210> 7

<211> 104

<212> PRT

<213> Streptomyces noursei

<400> 7

```

Asn Pro Gly Glu Thr Val Leu Pro Pro Gln Leu Arg Glu Glu Ile Ala
 1              5              10              15

Leu Leu Ala Val Tyr Leu Leu Ser Ser Gly Arg Gly Leu Leu Glu Glu

```


20

25

30

Pro Ala Asp Tyr Gly Ile Tyr Arg Cys Thr Asp Gly Ala Arg Arg Ala
 35 40 45

Leu Gln Leu Leu Asp Glu His Gly Gly Ser Thr Ala Arg Leu Thr Ala
 50 55 60

Val Arg Glu Arg Leu Asp Glu Val Met Phe Ala Pro Met Gly Glu Asp
 65 70 75 80

Arg Asp Met Gly Ala Ile Leu Asp Asp Leu Cys Arg Gln Met Ala Asp
 85 90 95

Ala Leu Pro Glu Ile Glu Thr Pro
 100

<210> 8

<211> 99

<212> PRT

<213> Streptomyces noursei

<400> 8

Met Leu Pro Pro Gln Leu Arg Glu Glu Ile Ala Leu Leu Ala Val Tyr
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Ser Gly Arg Gly Leu Leu Glu Glu Pro Ala Asp Tyr Gly
 20 25 30

Ile Tyr Arg Cys Thr Asp Gly Ala Arg Arg Ala Leu Gln Leu Leu Asp
 35 40 45

Glu His Gly Gly Ser Thr Ala Arg Leu Thr Ala Val Arg Glu Arg Leu
 50 55 60

Asp Glu Val Met Phe Ala Pro Met Gly Glu Asp Arg Asp Met Gly Ala
 65 70 75 80

Ile Leu Asp Asp Leu Cys Arg Gln Met Ala Asp Ala Leu Pro Glu Ile
 85 90 95

Glu Thr Pro

<210> 9

<211> 239

<212> PRT

<213> Streptomyces noursei

<400> 9

Met Leu Ala Gly Leu Val Pro Ala Pro Asp His Gly Met Arg Glu Glu
 1 5 10 15

Ile Leu Gly Asp Arg Ser Arg Leu Ile Arg Gln Arg Gly Glu His Ala

20

25

30

Leu Ile Gly Ile Ser Ala Gly Asn Ser Tyr Phe Ser Gln Lys Asn Thr
35 40 45

Val Met Leu Leu Gln Trp Ala Gly Gln Arg Phe Glu Arg Thr Asp Val
50 55 60

Val Tyr Val Asp Thr His Ile Asp Glu Met Leu Ile Ala Asp Gly Arg
65 70 75 80

Ser Ala Gln Glu Ala Glu Arg Ser Val Lys Arg Thr Leu Lys Asp Leu
85 90 95

Arg Arg Arg Leu Arg Arg Ser Leu Glu Ser Val Gly Asp His Ala Glu
100 105 110

Arg Phe Arg Val Arg Ser Leu Ser Glu Leu Gln Glu Thr Pro Glu Tyr
115 120 125

Arg Ala Val Arg Glu Arg Thr Asp Arg Ala Phe Glu Glu Asp Ala Glu
130 135 140

Phe Ala Thr Ala Cys Glu Asp Met Val Arg Ala Val Val Met Asn Arg
145 150 155 160

Pro Gly Asp Gly Val Gly Ile Ser Ala Glu His Leu Arg Ala Gly Leu
165 170 175

Asn Tyr Val Leu Ala Glu Ala Pro Leu Phe Ala Asp Ser Pro Gly Val
180 185 190

Phe Ser Val Pro Ser Ser Val Leu Cys Tyr His Ile Asp Thr Pro Ile
195 200 205

Thr Ala Phe Leu Ser Arg Arg Glu Thr Gly Phe Arg Ala Ala Glu Gly
210 215 220

Gln Ala Tyr Val Val Val Arg Pro Gln Glu Leu Ala Asp Ala Ala
225 230 235

<210> 10

<211> 277

<212> PRT

<213> Streptomyces noursei

<400> 10

Met Ser Trp Gly Gly Gln Asp Thr Cys Ser Trp Cys Gly Thr Gly Pro
1 5 10 15

Leu Gly Glu Ala Glu Asp Val Gly Arg Gln His Thr Ser His Ala Gly
20 25 30

Gly Pro Val Met Thr Gln Ala Ala Thr Val Thr Ala Thr Thr Ser Gln
35 40 45

Gly Arg Ala Leu Leu Arg Ser Leu Thr Pro Leu Phe Val Asp Ala Ala
50 55 60

Ile Pro Leu Gly Ser Tyr Phe Leu Leu Ala Glu Gly Phe Gly Met Ser
65 70 75 80

Thr Val Ala Ala Leu Ala Trp Ser Ser Val Val Pro Ala Leu Arg Thr
85 90 95

Ile Trp Gly Leu Val Arg Glu Arg Thr Val Asn Gly Leu Ala Leu Leu
100 105 110

Ile Leu Val Val Asn Val Val Gly Leu Ala Thr Ser Thr Leu Thr Gly
115 120 125

Asp Ala Arg Leu Met Met Ala Lys Asp Ser Gly Val Ser Ser Val Val
130 135 140

Gly Ile Ala Ile Leu Leu Ser Val Arg Gly Arg Arg Pro Leu Met Thr
145 150 155 160

Ala Gly Leu Arg Pro Trp Val Thr Lys Gly Ser Pro Glu Gly Asn Ala
165 170 175

Ala Trp Asp Arg Leu Trp Ala Arg Ser Ala Arg Phe Arg Gln Leu Glu
180 185 190

Arg Arg Phe Ser Thr Val Trp Gly Ser Ala Leu Leu Ile Glu Cys Val
195 200 205

Val Lys Val Val Gly Ala Tyr Val Leu Pro Val His Thr Met Val Trp
210 215 220

Leu Gly Thr Val Leu Thr Val Val Ala Ile Leu Leu Ala Met Val Val
225 230 235 240

Ala Gly Gly Gly Ser Ala Glu Pro Met Glu Arg Met Val Lys Ala Glu
245 250 255

Val Gly Ala Ala Gly Glu Ala Ala Thr Ala Gly Asn Ala Glu Pro Ala
260 265 270

Pro Ala Ala Ala Ala
275

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Streptomyces noursei

<400> 11

Glu Pro Val Asp Asp Ala Leu Ile Glu Gln Leu Leu Glu Ala Met Leu
1 5 10 15

Ala Ala Pro Thr
20

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Streptomyces noursei

<400> 12
Asn Glu Val Val Asn Tyr Glu Xaa Trp Gly Asn Arg
1 5 10

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Streptomyces noursei

<400> 13
Gln Ala Xaa Ser Phe Met Val Val Arg
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 14
garccsgtsg acgacgc

17

<210> 15
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 15
gcgtcgtcsa csggytc

17

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 16
aacgargtsg tsaactacga

20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 17
tcgtagttsa csacytcgtt

20

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 18
caggcstggw ssttcacgtt

20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 19
accatgaass wccasgcctg

20

<210> 20
<211> 47
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 20
cggctgcagg agaagggagc ggacatatgc ttgcaggctt agttccc

47

<210> 21
<211> 42
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 21

cggtcccgtg gatccaagct tctaggccgc gtcggccagc tc

42

<210> 22

<211> 36

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 22

gagcgggatc ctgcagtgtc atggggagga caggac

36

<210> 23

<211> 41

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 23

cgatcacgtg gatccaagct tgccaatcct gtacgcgatt t

41

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

INV

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 00 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLO/CGAmIF263/83FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0207728
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
POLYNUCLEOTIDES-ET-POLYPEPTIDES CODES PAR LESDITS POLYNUCLEOTIDES IMPLIQUES DANS LA SYNTHÈSE DE DERIVES DES DICETOPIPERAZINES		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom	GONDRY	
Prénoms	Muriel	
Adresse	Rue	Hameau de Chaumusson 4, chemin des Troux
	Code postal et ville	9 1 4 7 0 LIMOURS-EN-HUREPOIX
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom	GENET	
Prénoms	Roger	
Adresse	Rue	9, allée des Arpents
	Code postal et ville	9 1 4 7 0 LIMOURS-EN-HUREPOIX
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> Nom	LAUTRU	
Prénoms	Sylvie	
Adresse	Rue	50, rue du Hameau
	Code postal et ville	7 8 4 8 0 VERNEUIL-SUR-SEINE
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S)		
DU (DES) DEMANDEUR(S) 09 AOUT 2002		
OU DU MANDATAIRE		
(Nom et qualité du signataire)		
Béatrice ORES N° 92-4046		



BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270501

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLO/CGAmIF263/83FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0207728
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) POLYNUCLEOTIDES ET POLYPEPTIDES CODES PAR LESDITS POLYNUCLEOTIDES IMPLIQUES DANS LA SYNTHÈSE DE DERIVÉS DES DICETOPIPERAZINES		
LE(S) DEMANDEUR(S) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	PERNODET
	Prénoms	Jean-Luc
Adresse	Rue	21, rue des Jardins
	Code postal et ville	19 4 2 3 0 CACHAN
Société d'appartenance (facultatif)		
<input type="checkbox"/> 2	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<input type="checkbox"/> 3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		09 AOUT 2002
Béatrice ORES N° 92-4046		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.